

La mannheimiose : d'une liaison (moléculaire) fatale à une des principales maladies d'élevage des ruminants

FETT T.[‡], ZECCHINON L.[‡], VANDEN BERGH P., DESMECHT D.

[‡] Ont contribué de manière équivalente au travail

Département de Morphologie et Pathologie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, 20 Boulevard de Colonster, Bâtiment B43, 4000 Liège, Belgique

Correspondance : Prof. D. Desmecht

Email : daniel.desmecht@ulg.ac.be

RESUME

Les pneumonies bactériennes constituent un problème majeur dans l'élevage et l'engraissement des bovins, avec des répercussions très élevées en termes de morbidité et de mortalité. Parmi les différentes causes biologiques recensées, *Mannheimia haemolytica* tient le haut de l'affiche puisqu'elle est connue comme agent pathogène compliquant principal, voire systématique.

Une de ses particularités est qu'elle ne déclenche de pneumonie broncho-alvéolaire fibrino-hémorragique que chez les ruminants. Les lésions observées résultent d'une nécrose en masse des neutrophiles et macrophages et du relargage de leurs différents constituants. Au niveau moléculaire, cette spécificité trouve son origine dans l'intimité de la liaison entre la leucotoxine, le facteur de virulence majeur de la bactérie, et la sous-unité CD18 des récepteurs de surface leucocytaires β_2 -intégrines.

La revue décrit cette liaison et ses conséquences aux niveaux macroscopique et microscopique, avant de faire le point sur les dernières avancées de la recherche et d'ébaucher quelques perspectives thérapeutiques.

1. INTRODUCTION

1.1. Contexte

Si l'Homme a rapidement compris qu'il était plus rentable pour lui de se livrer à des activités d'élevage plutôt que de chasse, il s'est cependant rendu compte au fil du temps qu'une bonne santé des populations animales de rente, si elle était un gage de qualité et de lucrativité, n'était pas chose aisée. L'abattage sanitaire, la quarantaine, la restriction des importations, la vaccination et les traitements médicamenteux ont donc depuis toujours œuvré en vue, sinon d'une éradication, au moins d'un contrôle des maladies rencontrées. Dans le même ordre d'idées, l'administration, à grande échelle, de substances antibiotiques permet de lutter contre les agents pathogènes qui trouvent dans les conditions d'élevage concentrationnaires une niche de choix extrêmement propice à la contagion.

Ces pratiques séculaires présentent malheureusement des inconvénients

majeurs dont la prise de conscience est pourtant relativement récente : tout d'abord, la pression de sélection appliquée par l'Homme envers les animaux d'élevage s'exerce unilatéralement en faveur des critères relatifs aux productions alors que les bovins n'ont jamais été soumis à des pressions d'infection plus agressives qu'aujourd'hui. Ensuite, il est maintenant unanimement reconnu que l'administration à grande échelle de substances médicamenteuses en élevage bovin pose non seulement le délicat problème de leur rémanence ou de celle de leurs résidus dans les produits de consommation mais également celui de l'impact des antibiotiques, clairement établi, sur l'émergence de maladies dues à la prépondérance de souches multirésistantes (Ferber, 2000 ; Angulo *et al.*, 2004 ; Molbak, 2004). Cette situation est particulièrement préoccupante dans notre pays puisque des études publiées récemment démontrent que la Belgique fait partie des six pays européens qui consomment le plus d'an-

tibiotiques (Goossens *et al.*, 2005 ; Ferech *et al.*, 2006 ; van de Sande-Bruinsma *et al.*, 2008).

Le secteur des productions animales s'oriente donc de plus en plus d'une part vers une meilleure connaissance des maladies prédominantes et, d'autre part, vers la sélection d'animaux plus résistants à celles-ci. Du point de vue sociétal, l'intérêt est multiple puisque se donner les moyens de renoncer à injecter systématiquement des antibiotiques, des anti-inflammatoires et des bronchodilatateurs dès lors que des bovins manifestent des signes cliniques ne peut qu'aller dans le sens (i) d'une diminution du risque d'émergence de bactéries multirésistantes pathogènes (notamment pour l'Homme), (ii) d'une plus-value de la qualité de la viande en termes de contenu en résidus et (iii) d'une amélioration du bien-être et de la santé des animaux (iv) sans aucun impact négatif sur la rentabilité des exploitations, ni sur le prix de la viande à l'étal.

1.2. Les pneumonies des bovins

Diminuer l'importance des maladies bovines est donc devenu une priorité absolue, puisque l'on sait que ce sont les coûts liés aux maladies qui ont l'impact le plus important sur la rentabilité des fermes et ce, indépendamment du cours du marché (Gardner *et al.*, 1996). Ces coûts sont, sans la moindre équivoque, surtout causés par les maladies respiratoires dont l'incidence chez les veaux est de 25 % durant la première année. Les mâles sont plus touchés que les femelles, à la fois durant les périodes de présevrage et d'engraissement (Martin, 1981 ; Muggli-Cockett *et al.*, 1992 ; Griffin *et al.*, 2000 ; Speer *et al.*, 2001).

Parmi les maladies respiratoires, ce sont les pneumonies qui exercent, de loin, l'impact le plus flagrant : quelles que soient les conditions, elles sont responsables d'environ 75 % des maladies diagnostiquées (Jensen *et al.*, 1976 ; Roth, 1986 ; Edwards, 1996). Sur le plan de la morbidité, les taux moyens varient entre 15 et 45 % (Kelly, 1986) et sur celui de la létalité, les pneumonies sont directement incriminées dans 45 à 55 % des cas de maladie respiratoire (Perino, 1992 ; Vogel et Parrott, 1994 ; Edwards, 1996). D'un autre côté, la mise en œuvre des traitements médicamenteux censés guérir les maladies respiratoires génère approximativement 8 % des coûts de production totaux (Martin, 1981 ; Griffin *et al.*, 1995 ; Griffin, 1997), sans tenir compte des pertes encourues du fait de performances zootechniques (gain quotidien moyen, indice de consommation et production laitière) moindres. Par ailleurs, la race Blanc Bleu Belge, numéro un chez nous, se distingue des autres races bovines par des capacités pulmonaires et cardiaques largement inférieures à celles des autres bovins (Lekeux *et al.*, 1994). Ces déficits tant anatomiques que fonctionnels en font des animaux moins résistants en cas de maladie respiratoire avec une morbidité associée de 36 % (Bureau *et al.*, 2001). De plus, la même enquête démontre que le taux de mortalité associé aux maladies respiratoires pendant la première année de vie vaut 2,1 % en spéculation Blanc Bleu Belge alors qu'il n'est que de 1,4 % dans les autres races (Muggli-Cockett *et al.*, 1992 ; Bureau *et al.*, 2001).

Les principaux agents biologiques responsables des pneumonies des bovins

incluent (i) le nématode *Dictyocaulus viviparus*, (ii) les virus BHV-1 (bovine herpesvirus-1), RSV (respiratory syncytial virus), Pi (parainfluenza)-3, BVD-MD (bovine viral diarrhoea-mucosal disease), adénovirus et coronavirus et (iii) les bactéries *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis*, *Histophilus somni* et *Arcanobacterium pyogenes* (Dungworth, 1992 ; Lopez, 2001). Ces auteurs s'accordent cependant pour dire que, quelle que soit la cause initiale de l'atteinte pulmonaire (environnementale, virale, bactérienne ou parasitaire), c'est *M. haemolytica* que l'on retrouve le plus systématiquement comme agent compliquant. Tout se passe comme si les facteurs environnementaux et les agents microbiens « faisaient le lit » de *M. haemolytica* dans les poumons, cette dernière « faisant à son tour le lit » d'autres bactéries au premier rang desquelles on retrouve *P. multocida* et *A. pyogenes*.

L'utilisation d'antibiotiques à grande échelle en prophylaxie, métaphylaxie ou stimulation de croissance a favorisé l'émergence de souches de *M. haemolytica* résistantes à une large gamme d'antimicrobiens comme les β -lactames, les tétracyclines, les sulfonamides et les aminoglycosides (Watts *et al.*, 1994 ; Martel *et al.*, 1995 ; Hormansdorfer et Bauer, 1996 ; Caprioli *et al.*, 2000 ; Kehrenberg *et al.*, 2001). La plupart des gènes de résistance, dont certains ont pu être clonés et séquencés (Highlander, 2001), sont associés aux éléments génétiques mobiles et peuvent donc être aisément échangés entre bactéries (Kehrenberg *et al.*, 2001).

En résumé, diminuer l'impact de la mannheimiose tout en réduisant l'administration massive d'antibiotiques est une priorité tant du point de vue économique que de ceux de la santé publique et du bien-être animal.

2. LA MANNHEIMIOSE

2.1. *Mannheimia haemolytica*

Mannheimia haemolytica est un coccobacille à gram négatif, faiblement hémolytique, dont la taxonomie complète est : super-royaume des bactéries ; phylum des protéobactéries ; classe des gammaprotéobactéries ; ordre des pasteurellales ; famille des *pasteurellaceae* ; genre *Mannheimia*. Elle changea, depuis sa découverte

en 1885 par Théodore Kitt, plusieurs fois « d'identité » : baptisée *Bacterium bipolare multocidum* (Kitt, 1885), on la connut ensuite un certain temps sous le nom de *Pasteurella bovisepetica* (Jones, 1921) avant d'être renommée *Pasteurella haemolytica* en 1932 (Newson, 1932) et classifiée en deux biotypes, A et T, sur base de leur capacité à fermenter l'arabinose et le thréhalose, respectivement (Smith, 1961). Treize sérotypes A et quatre sérotypes T furent identifiés (Younan et Fodor, 1995), ces derniers étant reclassifiés en tant que *Pasteurella threhalosi* en 1990 (Bingham *et al.*, 1990 ; Sneath et Stevens, 1990). Neuf ans plus tard, des études basées sur des hybridations ADN-ADN et du séquençage de l'ARN 16S ont conduit à renommer les sérotypes A1, A2, A5-A9, A12-A14, A16 et A17 en tant que *Mannheimia haemolytica* (en hommage au biologiste allemand Walter Mannheim dont les recherches ont significativement contribué à la connaissance de la taxonomie de la famille des *pasteurellaceae*) alors que le dernier sérotype A11 devenait *Mannheimia glucosida* (Younan et Fodor, 1995 ; Angen *et al.*, 1999).

Des douzes sérotypes décrits, A1 et A2 prévalent de par le monde. A1 est connu comme l'agent causal majeur de la mannheimiose bovine, aussi connue sous le nom de pasteurellose ou fièvre des transports (*shipping fever*), même si d'autres sérotypes comme A6, A7, A9, A11 et A12 peuvent aussi être isolés (Quirie *et al.*, 1986). A1 et A2 sont tous deux capables de coloniser le tractus respiratoire supérieur des bêtes bovine et ovine mais sont souvent spécifiques. Ainsi, les bovins sains sont fréquemment porteurs du sérotype A2 dans leur tractus respiratoire supérieur mais sous l'effet d'un stress ou d'une coinfection, A1 remplace rapidement A2 en tant que sérotype principal (Frank et Smith, 1983), probablement suite à un transfert horizontal à partir d'animaux infectés (Highlander, 2001). Le sérotype A6 serait quant à lui en prévalence croissante au Royaume-Uni (Donachie, 1998) et aux Etats-Unis (Purdy *et al.*, 1997 ; Al-Ghamdi *et al.*, 2000) avec environ 30 % des souches sérotypées. Néanmoins, sur base des profils des lipopolysaccharides et des protéines de la membrane externe de chaque sérotype, il a été conclu que, excepté la nature de leurs capsules, les sérotypes A1 et A6 étaient extrêmement

similaires (Davies et Donachie, 1996 ; Morton *et al.*, 1996).

Les bases génétiques de la variation clonale entre les sérotypes n'ont pas encore été étudiées, même si la séquence complète d'une souche A1 a été publiée par le *Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center* (Highlander et Weinstock, 2004).

2.2. Pathogénie

La pathogénie des pneumonies à *M. haemolytica* fait intervenir différents paramètres comme des virus (*bovine parainfluenza virus 3*, *bovine herpes virus 1* et *bovine respiratory syncytial virus*), des bactéries (*Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis* et *Arcanobacterium pyogenes*), l'environnement (charge élevée en poussières, changements d'alimentation, températures excessives...), l'administration de glucocorticoïdes, le creux immunitaire ou encore le stress associé au sevrage, à l'écornage ou au transport, qui prédisposent l'animal (Yates, 1982 ; Dungworth, 1992 ; Lopez, 2001). Ces différents facteurs semblent altérer l'épithélium du tractus respiratoire supérieur de manière à permettre à la bactérie de le coloniser et de migrer du nasopharynx aux poumons où elle cause une pneumonie dite « de type bronchoalvéolaire » qui s'accompagne d'une morbidité et d'une mortalité élevées (Jensen *et al.*, 1976 ; Vogel et Parrott, 1994 ; Edwards, 1996).

Les signes cliniques sont variables quant à leur intensité, de frustes à très sévères, mais quelques faits caractéristiques peuvent être mentionnés : il y a toujours de la dépression et de l'anorexie, de la fièvre jusqu'à 42°C, une augmentation de la fréquence cardiaque, une perte de poids substantielle et une rhinite résultant en une décharge nasale mucopurulente ou un museau sec et encroûté. Un larmolement accru et une toux sont souvent présents. La fréquence respiratoire augmente dans les tous premiers stades, suivie par une dyspnée de sévérité telle qu'elle cause une respiration buccale et des grognements respiratoires dans certains cas. L'auscultation révèle des sons bronchiaux et vésiculaires accrus antéro-ventralement, se muant en râles d'abord humides puis secs. On peut aussi entendre des frictions pleurales. Les veaux peuvent se tenir avec les coudes en abduction et le cou étendu

(orthopnée). Certains animaux peuvent souffrir de diarrhée (Yates, 1982 ; Zecchinon *et al.*, 2005).

Macroscopiquement, ce type de pneumonie est caractérisé par une consolidation avec hépatisations rouge et grise des parties antéro-ventrales des poumons, parfois accompagnées de zones de pleurésie fibrineuse (figure 1) (Zecchinon *et al.*, 2005).

Microscopiquement, de larges zones de nécrose, ceinturées par des amas de neutrophiles dégénérants (ou pyocytes) en quantités très importantes, constituent la signature de *M. haemolytica* (figure 2). L'ampleur de cette nécrose est en fait concomitante à la cytolysse d'un nombre anormalement élevé de neutrophiles et macrophages

qui, via le déversement d'une multitude de composés toxiques (enzymes, histamine, prostaglandines...) *in situ*, aggravent les lésions pulmonaires (Yates, 1982 ; Slocombe *et al.*, 1985 ; Dungworth, 1992 ; Lopez, 2001 ; Zecchinon *et al.*, 2005).

Sur un plan biologique plus général, il faut constater que *M. haemolytica* n'est pas responsable de pneumonies chez les animaux non ruminants, ce qui suggère l'existence d'une virulence qui s'exprime spécifiquement envers ces derniers.

2.3. La leucotoxine

Plusieurs facteurs de virulence sont décrits pour *M. haemolytica* (Confer

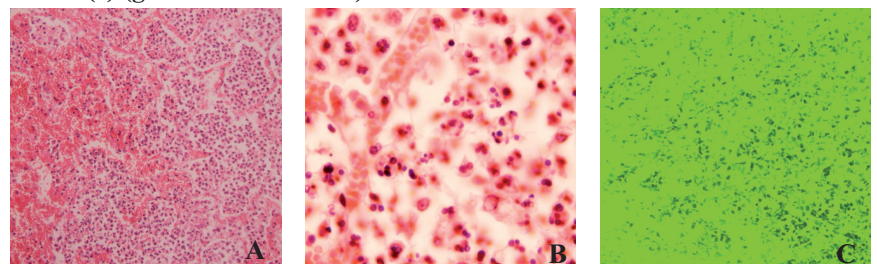
Figure 1: Pneumonie nécrosante multifocale et pleurésie fibrineuse viscérale où *Mannheimia haemolytica* a pu être mise en évidence.

Larges plages de nécrose observées sur un lobe diaphragmatique gauche coupé transversalement dans son tiers proximal.



Figures 2 : Lésions histologiques pulmonaires d'une infection à *Mannheimia haemolytica* (hématoxyline-éosine).

On constate une infiltration massive dans les alvéoles de leucocytes (a) (grossissement 200 x), s'avérant être des polymorphonucléaires neutrophiles (b) (grossissement 400 x) qui vont rapidement se nécroser en masse (c) (grossissement 200 x).



et al., 1990 ; Whiteley *et al.*, 1992 ; Tatum *et al.*, 1998 ; Jeyaseelan *et al.*, 2002) : ils incluent la capsule qui joue un rôle important dans l'adhérence et l'invasion, les protéines de la membrane externe qui provoquent la réponse immune, des adhésines qui sont impliquées dans la colonisation, une neuraminidase qui réduit la viscosité du mucus et permet une approche plus « intime » de la bactérie à la surface des cellules épithéliales, le lipopolysaccharide (LPS) et la leucotoxine (LktA).

Celle-ci est une protéine de 102 kDa sécrétée en phase logarithmique de croissance et appartient à la famille des toxines dites RTX (*repeats in toxin*), lesquelles comprennent toutes, près de leur extrémité N-terminale, des régions hautement conservées consistant en répétitions d'un nonapeptide de type L/I/V/F-X-GG-X-G-N/D-D-X (avec X = n'importe quel résidu), dont le nombre varie de 6 (comme la LktA) à 41 (Lo, 1990 ; Coote, 1992 ; Jeyaseelan *et al.*, 2002 ; Mena-Rojas *et al.*, 2004). Ces toxines comptent dans leurs rangs outre la LktA (Lilie *et al.*, 2000), les toxines de *M. glucosida* (Davies *et al.*, 2001 ; Davies *et al.*, 2002), *M. ruminantis* (GenBank AY425280), *M. varigena* (AY425279), *M. granulomatis* (AY425278) et *Pasteurella trehalosi* (Davies *et al.*, 2001 ; Davies *et al.*, 2002) ; la PILktA de souches *M. haemolytica*-like (Chang *et al.*, 1993a) ; les toxines ApxIA, -IIA, et -IIIA d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Frey *et al.*, 1991 ; Chang *et al.*, 1993b ; Schaller *et al.*, 1999) ; les variants ApxIA and -IIA d'*A. suis* (AshA) (Burrows et Lo, 1992 ; Kamp *et al.*, 1994 ; Schaller *et al.*, 2001 ; Satran et Nedbalcova, 2002), ApxIIA and -IIIA d'*A. rossii* (Schaller *et al.*, 2000), ApxIA d'*A. lignieresii* (Kolodrubetz *et al.*, 1989 ; Burrows et Lo, 1992 ; Satran et Nedbalcova, 2002), et ApxIIA d'*A. porcitosillarum* (Kuhnert *et al.*, 2005) ; AqxA d'*Actinobacillus equuli* (Berthoud *et al.*, 2002) ; PaxA de *Pasteurella aerogenes* (Kuhnert *et al.*, 2000) ; LtxA d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Kolodrubetz *et al.*, 1989 ; Lally *et al.*, 1989) ; MbxA de *Moraxella bovis* (Hess et Angelos, 2006), *M. bovoculi* et *M. ovis* (Angelos *et al.*, 2007) ; KkxA de *Kingella kingae* (Kehl-Fie et St Geme, 2007) ; HlyA et EhxA d'*Escherichia coli* uropathogènes et EHEC, respectivement (Welch *et al.*, 1983 ; Felmlee *et al.*, 1985) ; et

CyaA de *Bordetella bronchiseptica* et *B. pertussis* (Glaser *et al.*, 1988).

La LktA de *M. haemolytica* partage avec deux de ces toxines (la LtxA d'*A. actinomycetemcomitans* et l'ApxIIIA d'*A. pleuropneumoniae*) un ensemble de caractéristiques biologiques : tout d'abord, chacune d'elles est sécrétée par une bactérie qui n'est pathogène que pour une espèce donnée, causant respectivement une pneumonie broncho-alvéolaire fibrino-hémorragique chez les ruminants, une périodontite agressive chez l'Homme et une pleuropneumonie fibrino-hémorragique chez le porc. Dans les trois cas, les lésions sont caractérisées par des aires de nécrose de coagulation multifocales engendrées par la présence d'un nombre exceptionnellement élevé de neutrophiles et macrophages dégénérés ou en nécrose. Enfin, les trois toxines sont reconnues comme facteurs de virulence majeurs puisque (i) leur administration, sous formes native ou recombinante purifiées, conduit aux signes cliniques et au développement de lésions sévères (Kamp *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1998b ; Ambagala *et al.*, 1999 ; Sun *et al.*, 1999b ; Jeyaseelan *et al.*, 2000 ; Sun *et al.*, 2000 ; Cudd *et al.*, 2001 ; Jeyaseelan *et al.*, 2001a ; Deshpande *et al.*, 2002 ; Davies et Baillie, 2003) alors que (ii) les bactéries ne produisant plus les toxines perdent leur pouvoir pathogène (Tatum *et al.*, 1998). Ainsi, l'inactivation de la LktA par *gene knock-out* cause une inactivation partielle de virulence et ne déclenche presque plus de lésions pulmonaires bien que les souches sauvages et mutantes soient tout aussi capables de coloniser le tractus respiratoire supérieur des veaux (Highlander *et al.*, 2000).

Il est de plus intéressant de constater que si la leucotoxine doit son nom à la spécificité de liaison qu'elle exhibe vis-à-vis des leucocytes de plusieurs espèces de mammifères, elle n'induit la mort cellulaire que lorsqu'elle est fixée à ceux des ruminants (Kaehler *et al.*, 1980 ; Shewen et Wilkie, 1982 ; Silflow et Foreyt, 1994 ; Dassanayake *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2007 ; Fett *et al.*, 2008), suggérant que la spécificité d'interaction entre la LktA et les leucocytes des ruminants pourrait être tenue pour responsable de la cytotoxicité spécifique de *M. haemolytica* envers ces derniers.

3. LES CIBLES CHEZ L'HÔTE

3.1. *Neutrophiles et macrophages*

La pathogénie de la mannheimiose implique les neutrophiles et les macrophages dont le rôle central a été démontré expérimentalement par plusieurs équipes indépendantes ; ainsi, une exposition par aérosol à *M. haemolytica* induit, chez des veaux, une infiltration rapide de neutrophiles dans les poumons et une augmentation significative du *ratio* neutrophile/macrophage dans le liquide de lavage pulmonaire (Walker *et al.*, 1985). Parmi les leucocytes, les macrophages sont plus résistants que les neutrophiles aux effets lytiques de la LktA, et les macrophages alvéolaires des bêtes adultes sont plus résistants que ceux des veaux de moins de 16 semaines (O'Brien et Duffus, 1987).

Par ailleurs, lorsque des bovins sont déplétés de leurs propres neutrophiles circulants par un traitement à l'hydroxyurée, la pneumonie est moins sévère et moins étendue que chez l'animal normalement pourvu en neutrophiles (Slocombe *et al.*, 1985 ; Breider *et al.*, 1988 ; Weiss *et al.*, 1991). Ces données *a priori* paradoxales suggèrent que les neutrophiles endossent un rôle proactif dans la progression de la mannheimiose.

3.2. *Rôle primordial du CD18*

Une autre observation intéressante a permis de poser une hypothèse quant à la nature de l'interaction entre la LktA et les neutrophiles des ruminants : la LktA n'induit pas de cytolysse des leucocytes si ces derniers sont prélevés chez des animaux *BLAD* (acronyme désignant la maladie génétique baptisée *bovine leukocyte adhesion deficiency*) (Jeyaseelan *et al.*, 2000). Ce résultat est de nouveau paradoxal parce que ces animaux souffrent d'un déficit fonctionnel de leurs polymorphonucléaires neutrophiles qui ralentit voire abolit leur capacité à s'extraire du torrent sanguin par diapédèse, ce qui cause l'apparition récurrente de maladies. Au niveau moléculaire, le phénotype *BLAD* est causé par la mutation D128G dans la sous-unité β (ou CD18) des β_2 -intégrines (Shuster *et al.*, 1992) qui entraîne une diminution très importante de leur expression en surface (Cox *et al.*, 1997).

Les intégrines sont des protéines transmembranaires qui jouent un rôle majeur dans l'adhésion cellulaire bien

Tableau I : La famille des intégrines (tableau non exhaustif)

Sous-unités		Ligands et contre-récepteurs	Expression
β_1	α_1	Collagènes, laminine	T*, B*, Mo
	α_2	Collagènes, laminine	T*, NK, Mo, pl
	α_3	Fibronectine, laminine, collagènes	Mo, Tc, LAK
	α_4	Fibronectine (V25), VCAM-1	Mo, T*, B, CL, F
	α_5	Fibronectine	T*, Mo
	α_6	Laminine	T*, Mo, pl
	α_7	Laminine	T, Mo
	α_8	?	
	α_V	Vibronectine, fibronectine (?)	
β_2 (CD18)	α_L ou CD11a	ICAM-1, ICAM-2	T, B, Mo, N, NK
	α_M ou CD11b	Composant C3b du complément (inactivé), fibrinogène, facteur X, ICAM-1	Mo, NK
	α_X ou CD11c	Fibrinogène, composant C3b du complément (inactivé) ?	NK, N
	CD11d	?	?
β_3	α_{IIb}	Fibrinogène, fibronectine, facteur de von Willebrand, vitronectine, thrombospondine	pl
	α_V	Vitronectine, fibrinogène, fibronectine, facteur de von Willebrand, thrombospondine, fibronectine, ostéopontine, collagènes	B, Mo, pl, F
β_4	α_6	Laminine ?	T, Mo
β_5	α_V	Vitronectine	Mo
β_6	α_V	Fibronectine	L
β_7	α_4	Fibronectine (V25), VCAM-1	B
	α_{IEL}	?	
β_8	α_V	?	

B : lymphocyte B ; B* : lymphocyte B activé ; CL : cellule de Langerhans ; F : fibroblaste ; L : leucocyte ; LAK : cellule NK activée par l'IL-2 ; Mo : monocyte ; N : neutrophile ; NK : natural killer ; pl : plaquettes ; T : lymphocyte T ; T* : lymphocyte T activé ; Tc : lymphocyte T cytotoxique.

que leur reconnaissance en tant que récepteurs de surface ne date que de 1987 (Hynes, 1987). Depuis, elles ont été étudiées intensivement (plus de 40000 articles à ce jour) et semblent impliquées dans de nombreux processus biologiques, physiologiques et pathologiques. Toutes les intégrines sont des hétérodimères dont les sous-unités α et β sont associées non covalentiellement et possèdent chacune un domaine extracellulaire volumineux et des domaines transmembranaire et cytoplasmique plutôt courts (Hynes, 1992). Une vingtaine d'intégrines sont actuellement décrites ; elles sont classées en huit sous-familles selon leur sous-unité β commune (tableau I), par exemple la famille des β_2 -intégrines dont la sous-unité β_2 est le CD18.

Celle-ci s'associe avec les sous-unités α CD11a-d, formant ainsi les hété-

rodimères CD11a/CD18 ou LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen-1*) qui est quantitativement majoritaire, CD11b/CD18 ou Mac-1 (*Macrophage antigen-1*) ou encore CR3 (*Complement receptor 3*), CD11c/CD18 ou CR4 (*Complement receptor 4*) et CD11d/CD18 (Berman *et al.*, 2003). Les récepteurs CD11a-d/CD18 sont présents à la surface de tous les leucocytes et médient une adhésion de haute affinité à une grande variété de types cellulaires qui expriment un ou plusieurs de leurs ligands, à savoir les molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM)-1 à -5 et la *Junctional adhesion molecule* (JAM)-A. Cette sous-famille d'intégrines est ainsi responsable de la fixation des leucocytes à la surface des endothéliums, une des étapes préliminaires qui permet leur déplacement vers les lieux de la réaction inflammatoire (Bailly *et*

al., 1995 ; Gahmberg, 1997 ; Tian *et al.*, 1997 ; Zecchinon *et al.*, 2006a ; Zecchinon *et al.*, 2006b).

Dans le contexte de l'interaction de la LktA avec les β_2 -intégrines des ruminants, plusieurs études ont montré que l'effet cytotoxique de la LktA est atténué, voire supprimé, lorsque des leucocytes bovins sont incubés préalablement avec des anticorps dirigés contre les sous-unités CD11a ou CD18 du LFA-1 (Ambagala *et al.*, 1999 ; Li *et al.*, 1999 ; Jeyaseelan *et al.*, 2000). L'identification précise de la sous-unité liant la LktA a toutefois longtemps été controversée, le CD18 (Wang *et al.*, 1998a ; Ambagala *et al.*, 1999 ; Li *et al.*, 1999) et le CD11a (Jeyaseelan *et al.*, 2000) ayant chacun leurs partisans. Aujourd'hui cependant, les auteurs s'accordent sur le rôle primordial du CD18 et ce, grâce à quel-

ques avancées significatives ; ainsi, le professeur Srikumaran et son équipe ont tout d'abord mis en évidence par immunomarquage et séquençage N-terminal que la leucotoxine se fixait sur les différentes β_2 -intégrines contenues dans des lysats de neutrophiles bovins et qu'une préincubation de ces neutrophiles avec un anticorps monoclonal spécifique du CD18 réduisait les effets cytotoxiques (Ambagala *et al.*, 1999). Ils ont ensuite élégamment démontré que le CD18 était, selon leurs propres termes, nécessaire et suffisant pour médier la cytolyse de leucocytes en rendant une lignée murine, réputée résistante à la leucotoxine, sensible à cette dernière en la transfectant de manière stable avec l'ADN complémentaire encodant pour le CD18 bovin, lequel se retrouvait exprimé en surface associé au CD11a murin (Deshpande *et al.*, 2002). Ils ont par ailleurs, tout récemment, réitéré l'expérience avec le CD18 ovin (*Ovis aries* et *Ovis canadensis*) et obtenu des résultats similaires (Dassanayake *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2007). De plus, ils observent une forte corrélation entre le degré d'expression en surface du CD18 bovin (PMNs bovins>lymphocytes bovins~lignée transfectée) et le degré de cytolyse de ces cellules, ce qui s'explique par le fait que si les lymphocytes et la lignée transfectée n'expriment que le LFA-1 bovin et murin/bovin, respectivement, les PMNs quant à eux arborent toutes les β_2 -intégrines ; on sait en effet que la LktA se lie également au CD18 du Mac-1 bovin ou ovin (Lawrence *et al.*, 2008). De son côté, l'équipe du professeur Maheswaran a montré que si la leucotoxine se liait à la fois au CD18 du LFA-1 et du Mac-1 (Thumbikat *et al.*, 2005) ainsi qu'au LFA-1 porcin (Jeyaseelan *et al.*, 2000), les événements postérieurs à la liaison comme l'élévation de la concentration en calcium intracellulaire et la phosphorylation de la queue cytoplasmique du CD18 n'étaient observés qu'avec le LFA-1 bovin (Jeyaseelan *et al.*, 2000 ; Jeyaseelan *et al.*, 2001a ; Thumbikat *et al.*, 2005). D'autre part, des expérimentations avec des inhibiteurs du *I domain* du CD11a et des anticorps dirigés contre le *I-like domain* du CD18 donnent à penser que la leucotoxine se lie au CD18 (mais pas au niveau du *I-like domain* bien que celui-ci jouerait un rôle critique dans la signalisation induite par la leucotoxine conduisant à l'activation) et qu'à hautes concentrations en toxine, cette liaison serait suf-

fisante pour provoquer l'oligomérisation toxinique, la formation de pores, un influx de calcium et des dommages cellulaires menant à la cytolyse via toutes les β_2 -intégrines (Thumbikat *et al.*, 2005). La leucotoxine interagirait également avec le *I domain* du CD11a, mais ni avec le CD11b ou le CD11c (Jeyaseelan *et al.*, 2000), pour initier une cascade de signalisation conduisant à l'activation cellulaire (Yoo *et al.*, 1995) et à l'apoptose (Stevens et Czuprynski, 1996), événements qui prendraient toute leur ampleur lorsque la leucotoxine se trouverait en plus faible concentration (Thumbikat *et al.*, 2005). Par ailleurs, la cotransfection de la lignée d'origine humaine K-562, n'exprimant naturellement aucune β_2 -intégrine, par les CD11a et CD18 bovins, conduit à l'expression en surface de l'hétérodimère, à la liaison de la leucotoxine sur le LFA-1 ainsi que sur le CD11a et le CD18 seuls (par déplétion de lysats cellulaires par immunoprécipitation à l'aide d'anticorps spécifiques), à la phosphorylation de la tyrosine de la queue cytoplasmique du CD18, à une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et à la cytolyse (Dileepan *et al.*, 2005b). Enfin, la cotransfection de cette même lignée avec les ADN complémentaires encodant pour les CD11a bovin et CD18 humain conduit à l'expression en surface de l'hétérodimère mais pas à la fixation de la leucotoxine (Dileepan *et al.*, 2005a).

En conclusion, toutes ces données suggèrent dans leur ensemble que c'est l'interaction entre la LktA et la sous-unité CD18 des β_2 -intégrines des ruminants qui est responsable de la spécificité de la virulence de la LktA, et donc de *M. haemolytica*, envers les leucocytes de ces derniers. Plus précisément, (i) la leucotoxine doit nécessairement se fixer sur la sous-unité CD18 des β_2 -intégrines des ruminants et du porc à un domaine autre que le *I-like domain*, (ii) cette liaison serait, à haute concentration en toxine, suffisante pour induire la formation de pores et la nécrose et (iii) la liaison avec le CD11a des ruminants (via le *I domain*) ou de la souris permettrait, à plus faibles concentrations en toxine, de par une interaction avec le *I-like domain* du CD18, le déclenchement des cascades d'activation cellulaire conduisant à l'apoptose. Dès lors, diminuer voire supprimer l'impact de la mannheimiose en spéculation

bovine revient à identifier le site de liaison précis de la leucotoxine sur le CD18, de manière (i) à ouvrir la voie à la sélection d'animaux naturellement résistants et/ou (ii) à mettre en œuvre une stratégie médicamenteuse spécifique pour augmenter la productivité et le bien-être animal tout en réduisant les apports massifs d'antibiotiques, anti-inflammatoires et bronchodilatateurs. Signalons par ailleurs que le même raisonnement peut être appliqué à LtxA et ApxIIIa qui se lient également au CD18 des leucocytes de leur espèce-cible (Li *et al.*, 1999 ; Dileepan *et al.*, 2007a ; Vanden Bergh *et al.*, soumis).

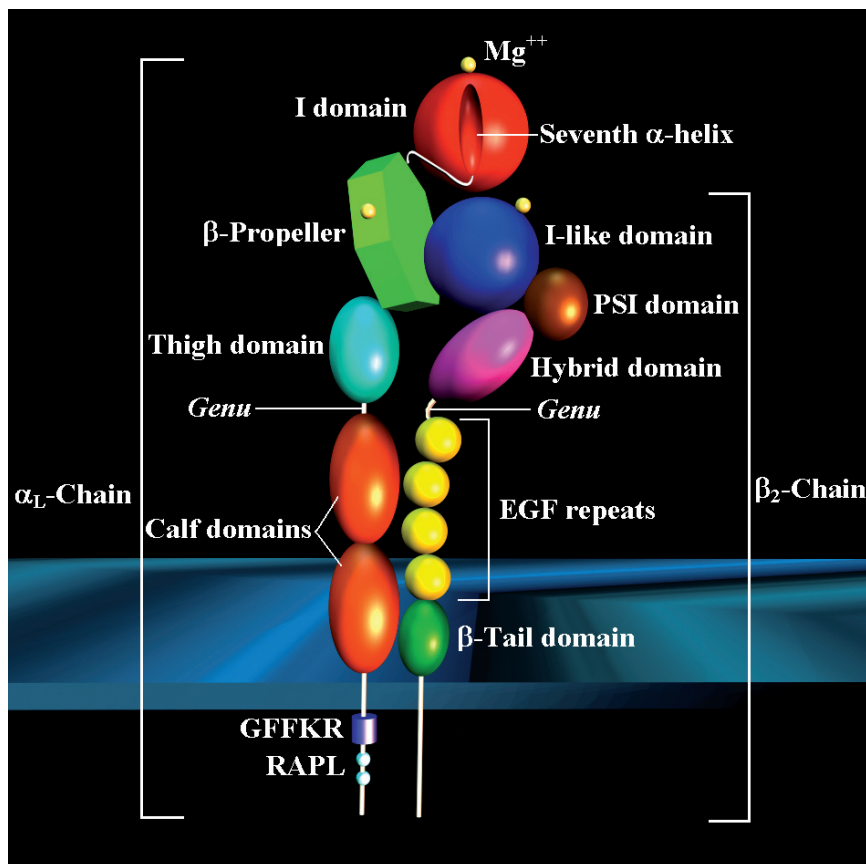
3.3. Motif(s) moléculaire(s) du CD18 interagissant avec la LktA

Des résultats contradictoires

Récemment, deux équipes visant à identifier le site précis de liaison de la leucotoxine sur le CD18 bovin publièrent des résultats apparemment contradictoires. Elles ont tablé sur l'ingénierie de lignées cellulaires stables exprimant des LFA-1 chimériques murin/bovin (Gopinath *et al.*, 2005) ou humain/bovin (Dileepan *et al.*, 2005a) mais selon deux principes opposés ; soit rendre sensible une lignée cellulaire qui ne l'est pas en intégrant des fragments du CD18 bovin dans un LFA-1 murin (Gopinath *et al.*, 2005), soit rendre résistante une lignée sensible en intégrant des fragments du CD18 humain dans un LFA-1 bovin (Dileepan *et al.*, 2005a). Le site de liaison de la leucotoxine entraînant les effets biologiques fut ainsi annoncé soit dans les 291 premiers résidus du CD18 (Gopinath *et al.*, 2005), c'est-à-dire dans la portion extracellulaire contenant le domaine *PSI* (*plexin-semaphorin-integrin*), le site d'adhésion dépendant des ions métalliques (*MIDAS*, *metal ion-dependent adhesion site*) et une partie du *I-like domain*, sur lequel la toxine n'était pas sensée se lier selon des expérimentations réalisées par l'équipe concurrente avec des anticorps dirigés contre ce domaine (Thumbikat *et al.*, 2005), soit entre les résidus 500 et 600 de la portion extracellulaire du CD18, correspondant aux domaines *EGF* (*epidermal growth factor*) -2 à -4 (Dileepan *et al.*, 2005a), puis plus précisément entre les résidus 541-581 correspondant au domaine *EGF-3* (Dileepan *et al.*, 2007b) (figure 3).

Figure 3 : Représentation schématique des domaines structuraux du récepteur LFA-1 (α L β 2 ou CD11a/CD18).

Les sous-unités CD11a et CD18 possèdent chacune un large domaine extracellulaire et de courtes portions transmembranaire et cytoplasmique. Chez le CD11a, le *I domain* (rouge) lie les ICAMs sous la dépendance du magnésium (jaune clair) au niveau du *Metal Ion Dependent Adhesion Site (MIDAS)*. La septième hélice α du *I domain* relie celui-ci à la β -propeller region (vert mat) qui se prolonge par le *thigh domain* (turquoise) puis les *calf domains* (orange). Chez le CD18, le *domain plexin-semaphorin-integrin (PSI)*, coloré en chocolat, est relié par des ponts disulfures à l'*hybrid domain* (mauve) au centre de la région qui relie le *I-like domain* aux quatre répétitions *EGF-like* (jaune). Le quatrième module s'étend par le β -tail domain (vert brillant) au travers de la membrane. Le motif charnière (*GFFKR*) et le site *RAPL* sont indiqués respectivement par un cylindre mauve clair et de petites sphères bleues claires. Les sites de liaison des cations bivalents sont représentés par de petites sphères jaunes. Le schéma a été réalisé avec le programme Ulead Cool 3D 3.5. Les différents domaines ne sont pas strictement dessinés à l'échelle.



Chacune de ces approches a bien entendu ses inconvénients puisque le remplacement d'un domaine conférant ou abolissant la liaison de la toxine ne signifie pas automatiquement que celle-ci s'y lie ou non. En effet, la modification de tel ou tel domaine peut entraîner des modifications de structure (par exemple lors du repliement de la protéine) qui, indirectement, modifient le site de liaison. Ainsi, si le *I domain* du CD11a se replie avant l'association avec le CD18, il n'en est pas de même pour le β -propeller qui reste non replié dans les 12 heu-

res suivant la synthèse du CD11a seul, suggérant que le *I domain* et le β -propeller se replient indépendamment l'un de l'autre et que le second arbore une interface avec le CD18 (Huang et Springer, 1997). Des résultats similaires sont d'ailleurs observés avec le CD11b (Lu *et al.*, 1998).

Ensuite, notons que les CD18 bovin et humain sont constitués de 769 résidus alors que le murin comprend deux résidus supplémentaires, un au niveau du peptide signal et l'autre étant le 7^e résidu après le dernier domaine *EGF*. Du point de vue des identités, le CD18

présente un pourcentage de 83 % par rapport à son homologue humain et 81 % par rapport à son homologue murin. *A priori*, ces différences ne devraient donc pas rendre compte des différents résultats obtenus. Par contre, il est intéressant de noter que le protocole de purification de la leucotoxine diffère pour les deux expérimentations ; la protéine ayant été purifiée par chromatographie d'immunoaffinité (Gopinath *et al.*, 2005) ou par extraction après électrophorèse en conditions dénaturantes (Dileepan *et al.*, 2005a), ce qui peut sembler a priori problématique pour des études de liaison.

Par ailleurs, une approche plus « chirurgicale » découlant du relevé des 16 sites individuels pour lesquels un résidu « A » était systématiquement conservé chez les ruminants alors qu'il était systématiquement remplacé par un résidu « B » chez l'homme, la souris et le chien (Zecchinon *et al.*, 2004) et consistant à construire les CD18 bovins mutants correspondants, n'a donné aucun résultat probant, c'est-à-dire qu'aucun d'eux n'est, à titre individuel, responsable de la spécificité d'espèces qu'exhibe la LktA vis-à-vis des CD18 des ruminants (Zecchinon *et al.*, soumis). Il est toutefois possible que plusieurs sites, voire plusieurs domaines, soient nécessaires à l'induction d'une toxicité spécifique.

Des chimères construites cette fois en remplaçant uniquement des régions bien définies du CD18 bovin (le domaine *PSI*, le *I-like domain* ou les domaines *EGFs*) par leur correspondant humain, de manière à perturber le moins possible la structure tridimensionnelle de l'intégrine résultante et ce, contrairement aux équipes précédentes qui ont divisé le CD18 de manière plus aléatoire, ont confirmé le rôle des domaines *EGFs* (Zecchinon *et al.*, soumis). Il a aussi été montré que les modules *EGF*-2, 3, et 4 du CD18 humain étaient critiques pour l'induction de la leucolyse par la LtxA d'*A. actinomycetemcomitans* (Dileepan *et al.*, 2007a).

Une nouvelle théorie

Par contre, le remplacement du module *EGF*-3 bovin par celui d'une autre espèce insensible que l'Homme, à savoir le porc, ne permet pas d'abolir la sensibilité à la leucotoxine des transfectants générés (Zecchinon *et al.*, soumis). La substitution du

module *EGF-3* du CD18 bovin par celui d'un CD18 LktA-résistant ne résulte donc pas automatiquement en la suppression de la signalisation *outside-in* déclenchée par la liaison de la LktA et conduisant aux phénomènes d'apoptose/nécrose, ce qui confirme cette fois les données observées avec la chimère bovine/murine B291M (module *EGF-3* d'origine murine) pour laquelle un effet cytotoxique est induit par la LktA (Gopinath *et al.*, 2005) alors qu'il est clairement établi que les leucocytes murins sont insensibles (Deshpande *et al.*, 2002).

Pris dans leur ensemble, toutes ces données suggèrent que l'effet cytotoxique de la LktA envers les leucocytes bovins serait en fait médié par deux sous-domaines distincts du CD18, le premier, encore à découvrir, présent entre les résidus 1 à 291 (Gopinath *et al.*, 2005) et le second étant le domaine *EGF-3*. Ainsi, si l'on accepte cette hypothèse, toutes les données publiées à ce jour concordent : les CD18 murin et porcine possèderaient un domaine *EGF* fonctionnel, mais pas le CD18 humain. Par contre, celui-ci arborerait le bon motif N-terminal, contrairement aux CD18 murin et porcine. Les CD18 des ruminants contiendraient bien évidemment les deux motifs. De plus, il a été montré que ni l'acylation de la LktA ni ses 344 résidus N-terminaux ne sont requis pour la liaison au CD18 alors qu'ils sont essentiels pour l'élévation de la concentration en calcium intracellulaire, la génération des espèces réactives de l'oxygène, la production d'interleukine-8 et la cytolyse des cellules-cibles (Thumbikat *et al.*, 2003), plaidant ainsi pour la présence de deux motifs sur la toxine également. Ce n'est donc pas parce qu'une toxine RTX se lie à un récepteur LFA-1 qu'il se produit inexorablement un effet cytotoxique ; il se pourrait ainsi que ces toxines doivent passer par une première étape de liaison spécifique du récepteur suivie d'une seconde plus spécifique, indispensable à l'induction des mécanismes cytopathogènes.

Des sucres responsables ?

Enfin, un rôle éventuel des glycosylations du CD18 n'est pas à exclure. Les deux sous-unités des β_2 -intégrines sont en effet des glycoprotéines de type I qui sont soumises à plusieurs processus de modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique rugueux (dont la glycosylation) indis-

pensables à l'expression en surface d'un récepteur fonctionnel. Plusieurs sites potentiels de *N*-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) ont été révélés par des programmes bioinformatiques au sein de l'hétérodimère (Zecchinon *et al.*, 2006a) et des analyses structurales ont montré que le LFA-1 humain contenait des taux élevés de chaînes oligosaccharidiques complexes de haut poids moléculaire et mannosylées sans qu'il y ait un type de glycosylation spécifique d'une sous-unité (Asada *et al.*, 1991). Ces glycosylations jouent un rôle dans l'interaction des toxines RTX avec leur récepteur β_2 -intégrine puisque le traitement de cellules sensibles par des glycosidases ou la tunicamycine (un antibiotique qui bloque la *N*-glycosylation des protéines néosynthétisées) diminue la liaison de la toxine CyaA de *B. pertussis* à ces cellules et réduit également son activité cytotoxique adénylate cyclase (Morova *et al.*, 2008). De plus, certains saccharides libres (*N,N'*-diacétylchitobiose, *N,N',N''*-triacétylchitotriose, D-mannose, *N*-acétyllactosamine, acide sialique) sont capables d'inhiber la liaison de cette toxine à la surface cellulaire (Morova *et al.*, 2008). Enfin, le traitement par ces glycosidases diminue également le taux de mortalité cellulaire induit par les toxines LtxA et HlyA (Morova *et al.*, 2008).

Lorsqu'on étudie la structure de ces fonctions saccharidiques, on peut les comparer aux branches d'un arbre ; plus on s'éloigne du tronc, plus les branches se ramifient et plus la composition en sucre peut varier. Ce phénomène est appelé la microhétérogénéité (Varki et Sharon, 2008) : à un site d'attachement d'un glycane sur une protéine donnée, synthétisée par un type cellulaire, un éventail de variations peut être trouvé dans la structure de ces chaînes. Celle-ci peut varier considérablement d'un site de glycosylation à un autre, d'une glycoprotéine à une autre et d'un type cellulaire à un autre (Varki et Sharon, 2008). Ainsi, une protéine donnée, codée par un seul gène, peut exister sous plusieurs « glycoformes » constituant chacune une espèce moléculaire distincte. Cette microhétérogénéité s'expliquerait par la rapidité avec laquelle de multiples réactions de glycosylations et déglycosylations, séquentielles et partiellement compétitives, se déroulent dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi au cours du proces-

sus de synthèse de la glycoprotéine.

S'il est reconnu que le *core* des principales classes de glycanes tend à être conservé au travers des espèces (Varki et Sharon, 2008), il y a cependant une diversité considérable au niveau des chaînes externes, même entre espèces relativement proches. Le rôle de cette variabilité n'est pas clair, elle pourrait être une sorte de générateur de diversité, modulant les fonctions de reconnaissance endogènes et/ou permettant d'échapper à l'infection par des microbes et parasites pouvant se lier avec une haute spécificité à certaines structures des glycanes (Varki et Sharon, 2008). Les branches variables terminales ne devraient donc pas constituer un site de liaison spécifique de la LktA, du fait même de la diversité qui doit y être générée puisque pour un même site de *N*-glycosylation sur deux récepteurs LFA-1 exprimés par un même leucocyte, les branches saccharidiques terminales peuvent varier. Etant donné que (i) ces glycosylations interviennent dans l'adhésion de certaines toxines RTX sur la β_2 -intégrine (Morova *et al.*, 2008) et (ii) que la leucotoxine semble pouvoir se lier au LFA-1 de différentes espèces sans induire nécessairement l'effet toxique (Sun *et al.*, 1999b ; Jeyaseelan *et al.*, 2001a ; Jeyaseelan *et al.*, 2001b), il se pourrait que la LktA parvienne à se lier au *core* d'un (de) *N*-glycane(s) (hautement conservé entre espèces), peut-être en association avec des résidus peptidiques également conservés. Toutefois, dans le cadre des β_2 -intégrines, certains indices nous permettent d'émettre l'hypothèse que les structures saccharidiques pourraient être dans leur ensemble bien conservées d'une espèce à l'autre du fait (i) de la conservation des sites de *N*-glycosylations sur le LFA-1 (Varki et Sharon, 2008), (ii) du rôle prépondérant de ces *N*-glycanes dans les processus physiologiques centraux faisant intervenir l'adhésion β_2 -intégrine/ligand (Becker et Lowe, 1999 ; Zhao *et al.*, 2008) et (iii) de la capacité des leucocytes d'une espèce à s'extravaser dans une xénogreffe et à la détruire mettant donc en bon rapport les β_2 -intégrines glycosylées d'une espèce avec les ligands endothéliaux d'une autre espèce (Ohta *et al.*, 1998 ; Hauzenberger *et al.*, 2000 ; Holgersson *et al.*, 2002). L'interaction induisant l'action cytotoxique spécifique doit donc sans doute être uniquement attribuée à des résidus pep-

tidiques spécifiques du CD18 des ruminants.

3.4. *Liaison et mort cellulaire*

Plusieurs modes d'action sont proposés pour expliquer les effets délétères consécutifs à la liaison de la LktA sur le CD18.

Radeaux lipidiques et internalisation

En conditions physiologiques, lorsque le récepteur LFA-1 entre en contact avec son ligand, il se produit une activation de la calpaïne qui va cliver la taline, protéine qui accroche le LFA-1 au cytosquelette par la queue cytoplasmique du CD18. Cette libération du récepteur permet alors le regroupement des LFA-1 dans les radeaux lipidiques (RL), des régions particulières de la membrane cytoplasmique riches en cholestérol et en sphingolipides dans lesquelles se regroupent certaines protéines membranaires dans un but fonctionnel (Luo *et al.*, 2008). Il a été montré récemment qu'ils jouaient un rôle actif dans l'effet induit par la LktA et la LtxA puisqu'(i) une diminution de l'effet cytotoxique de ces dernières est observée lorsque les leucocytes sont incubés avec un chélateur du cholestérol membranaire (Fong *et al.*, 2006 ; Atapattu et Czuprynski, 2007), (ii) une préincubation avec la filipine qui séquestre les RL, inhibe l'effet de la LktA (Atapattu et Czuprynski, 2007) et que (iii) leur reconstitution par l'apport de cholestérol exogène restaure l'effet cytopathogène de ces toxines (Fong *et al.*, 2006 ; Atapattu et Czuprynski, 2007).

Fong et ses collaborateurs ont aussi montré que la LtxA et son récepteur LFA-1 humain se retrouvaient en plus grosse quantité dans la fraction des RL des cellules exposées à la toxine et en ont conclu que deux conditions semblent nécessaires à la lyse cellulaire induite par la LtxA : (i) la liaison de la toxine au LFA-1 (des cellules déficientes en LFA-1 n'accumulent pas la toxine dans les radeaux et ne sont pas lysées) et (ii) la migration et le regroupement de ces complexes dans les RL (Fong *et al.*, 2006). Par contre, si la cytochalasine (un inhibiteur de la polymérisation de l'actine) permet bien le regroupement des LFA-1 humains dans les radeaux lipidiques, en présence ou l'absence de la LtxA, elle inhibe néanmoins l'effet de la LtxA, indiquant que le regroupement des

LFA-1 par eux-mêmes ne suffit pas pour reproduire le mécanisme d'action cytotoxique et qu'il doit être médié par l'actine (Fong *et al.*, 2006).

Cependant, des résultats différents (mais les deux équipes n'ont pas étudié tout à fait de la même façon l'incorporation potentielle des récepteurs LFA-1 dans les RL) ont été obtenus par Atapattu et son équipe concernant l'incorporation du LFA-1 bovin dans les RL de leucocytes exposés à la LktA puisque le récepteur ne se retrouvait pas dans les RL des cellules, qu'elles soient ou non traitées avec la LktA. Celle-ci ne se retrouverait associée que pour ~4 % au LFA-1, pour ~47 % aux RL, et le restant (~49 %) ne serait ni associé au LFA-1 ni aux fractions lipidiques des radeaux (Atapattu et Czuprynski, 2007). Dès lors, ils suggèrent que la liaison au LFA-1 pourrait être une étape intermédiaire, temporaire mais indispensable, d'un processus qui aboutirait ensuite à la dissociation du complexe toxine/récepteur et à son transfert à un autre partenaire, trouvé dans les radeaux lipidiques. Par ailleurs, la LktA est internalisée au cours du processus cytotoxique et la cytochalasine réduit cette incorporation cellulaire mais également l'effet cytopathogène de la LktA (Atapattu et Czuprynski, 2007), ce qui s'expliquerait par le fait que l'internalisation de la LktA puisse se produire sans être complexée au LFA-1. Parmi les voies d'endocytose, on distingue celles qui dépendent de la clathrine de celles qui dépendent des radeaux lipidiques. Il semble ainsi que la LktA puisse, en plus de se retrouver dans les radeaux lipidiques, être internalisée par la cellule selon la voie dépendante de la clathrine (Atapattu et Czuprynski, 2007) en faisant intervenir notamment la dynamine-2 (Urrutia *et al.*, 1997 ; Atapattu *et al.*, 2008), la protéine Eps15 en association avec l'adaptateur AP2 (Rappoport *et al.*, 2004) et la β -actine (Dykstra *et al.*, 2003).

Enfin, étant donné la faible quantité de toxine associée au récepteur, il se pourrait aussi qu'il serve plusieurs fois de distributeur de toxine aux RL.

Lkt et voies de signalisation intracellulaires

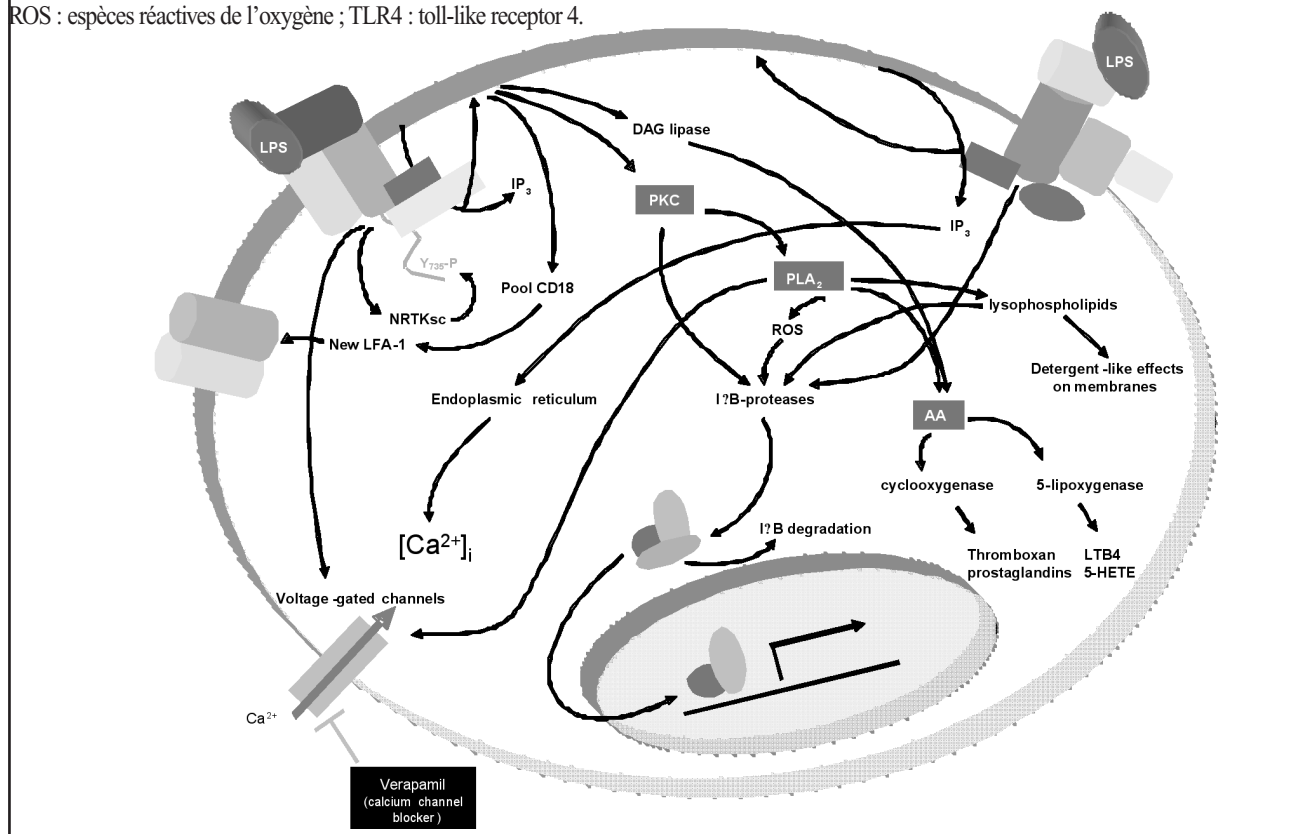
Brièvement, suivant que la LktA soit en faible ou haute concentration, elle induit respectivement l'apoptose ou la nécrose chez les leucocytes bovins,

ovins ou caprins. Il n'est cependant pas aisé de distinguer les effets de la LktA et ceux des LPS, étant donné qu'ils peuvent agir ensemble (quand ils forment des complexes) ou séparément selon de multiples voies cellulaires (Sun *et al.*, 2000 ; Cudd *et al.*, 2001) dont les principales sont reprises à la figure 4 (Zecchinon *et al.*, 2005) pour conduire entre autres à une élévation de la concentration de calcium intracellulaire (Ortiz-Carranza et Czuprynski, 1992), une poussée oxydative (Maheswaran *et al.*, 1992) et la production de plusieurs médiateurs lipidiques (Henricks *et al.*, 1992 ; Clinkenbeard *et al.*, 1994) et de cytokines proinflammatoires (Yoo *et al.*, 1995).

Le premier effet induit par la liaison de la LktA au LFA-1 bovin est une phosphorylation de la queue cytoplasmique du CD18 via une cascade indépendante de tyrosine kinases mais impliquant des kinases Src et PI3 (Jeyaseelan *et al.*, 2001a) comme cela se produit lorsque ce récepteur lie ses ligands physiologiques. Cette interaction mimerait donc les effets d'une activation du récepteur par la voie *outside-in* pouvant expliquer la mobilisation consécutive des complexes toxine/LFA-1 dans les radeaux lipidiques (Atapattu et Czuprynski, 2007). Cette liaison est connue pour impliquer des protéines G (Hsuan *et al.*, 1998 ; Jeyaseelan *et al.*, 2001b) et pour causer, d'une façon dose-dépendante, une élévation marquée et rapide de la concentration en calcium intracellulaire dans les leucocytes bovins (Czuprynski *et al.*, 1991 ; Ortiz-Carranza et Czuprynski, 1992 ; Hsuan *et al.*, 1998 ; Jeyaseelan *et al.*, 2001a) qui résulte principalement d'un flux entrant du milieu extracellulaire via des canaux (*voltage-gated channels*) (Gerbig *et al.*, 1989 ; Ortiz-Carranza et Czuprynski, 1992 ; Hsuan *et al.*, 1998 ; Hsuan *et al.*, 1999). Cette entrée de calcium est clairement impliquée dans la cytolyse (Gerbig *et al.*, 1989) et est essentielle pour déclencher la translocation du NF- κ B dans le noyau (détectable après cinq minutes d'exposition) ainsi que la production de cytokines proinflammatoires (Yoo *et al.*, 1995 ; Lafleur *et al.*, 1998). *A contrario*, de faibles concentrations en LktA provoquent une élévation de calcium sensiblement retardée et proportionnellement moindre (Hsuan *et al.*, 1998). Classiquement, il est reconnu qu'à haute concentration, les

Figure 4 : Voies de signalisation déclenchées par la LktA et le LPS pour induire la cytotoxicité des leucocytes

AA : acide arachidonique ; DAG : diacylglycéril ; 5-HETE : acide 5-hydroxy-eicosatétraénoïque ; IP₃ : inositol triphosphate ; LBP : LPS binding protein ; LKTA : leucotoxine ; LPS : lipopolysaccharide ; LTB₄ : leucotriène B₄ ; NRTKsc : nonreceptor tyrosine kinase signalling cascade ; PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; PLA₂ : phospholipase A₂ ; PLC : phospholipase C ; PKC : protéine kinase C ; PTK : protéine tyrosine kinase ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; TLR4 : toll-like receptor 4.



toxines RTX induisent très rapidement (< 20 minutes) de la nécrose cellulaire sans signes d'apoptose (Clinkenbeard *et al.*, 1989a ; Clinkenbeard *et al.*, 1989b ; Taichman *et al.*, 1991 ; Eguchi *et al.*, 1997 ; Korostoff *et al.*, 1998) tandis qu'à faible concentration, elles provoqueraient au terme de plusieurs heures de la pyroptose (Fink et Cookson, 2005), une mort cellulaire programmée proinflammatoire (Mangan *et al.*, 1991 ; Stevens et Czuprynski, 1996 ; Korostoff *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 1998a ; Sun *et al.*, 1999a ; Yamaguchi *et al.*, 2001). L'équilibre entre nécrose et pyroptose dépendrait donc de la dose en toxine.

Dans les lésions pulmonaires, les zones de nécrose de coagulation sont séquestrées par une enveloppe dense de cellules inflammatoires à des stades divers de dégénérescence et dans laquelle se retrouve *M. haemolytica*. Lorsqu'un leucocyte sort du vaisseau sanguin pour s'y intégrer, il doit donc être confronté à des concentrations croissantes de LktA, au départ sous-lytiques et apoptotiques (les cellules en pyroptose vivent encore plusieurs heures, libérant des cytokines inflammatoires entretenant l'appel neutrophili-

que) et ensuite nécrotiques (le contenu libéré des neutrophiles nécrosés va digérer le tissu pulmonaire). Aux doses sous-lytiques, le développement de la pyroptose par la toxine RTX pourrait provenir : (i) de la liaison et de l'activation des récepteurs β_2 -intégrines déclenchant des cascades de signaux intracellulaires, (ii) de l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire provoquée par l'activation du récepteur et la formation de pores membranaires (en quantité insuffisante pour produire la cytolyse) et (iii) de l'altération d'organites tels que les mitochondries suite à l'endocytose et le trafic intracellulaire de la toxine (Karakelian *et al.*, 1998). Par contre, l'incorporation d'une grande quantité de toxine dans les RL (processus initial et rapide) pourrait être responsable des lésions membranaires létales générant un influx d'eau et d'électrolytes (K⁺ et Cl⁻) causant une chute du potentiel membranaire, le gonflement cellulaire et l'explosion membranaire qui correspondraient à l'action cytolytique et nécrotique rapide (Karakelian *et al.*, 1998 ; Korostoff *et al.*, 1998).

De fait, l'exposition *in vitro* des leucocytes à des doses sous-lytiques de

LtxA et LktA induit, au bout de nombreuses heures, les signes classiques d'apoptose : une diminution de la taille cellulaire, le bourgeonnement de la membrane cytoplasmique par réorganisation du cytosquelette, des altérations sélectives dans la perméabilité membranaire, la condensation de l'ADN nucléaire, une flambée respiratoire avec production de réactifs de l'oxygène, une diminution du potentiel transmembranaire $\Delta\Psi_m$ mitochondrial, un gonflement de la matrice et une déchirure de la membrane externe des mitochondries aboutissant à une libération du cytochrome C de l'espace intermembranaire dans le cytosol, l'activation de Apaf-1 et des pro-caspases-1, -3 et -9, le clivage caspase-dépendant de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) et la fragmentation de l'ADN (Dyer *et al.*, 1985 ; Czuprynski *et al.*, 1991 ; Maheswaran *et al.*, 1992 ; Korostoff *et al.*, 2000 ; Yamaguchi *et al.*, 2001 ; Kelk *et al.*, 2003 ; Atapattu et Czuprynski, 2005 ; Dileepan *et al.*, 2005a ; Atapattu *et al.*, 2008 ; Chien *et al.*, 2008). La façon dont la toxine enclenche cette voie apoptotique n'est pas encore claire. Il est reconnu depuis plusieurs décennies

que la séquestration de larges quantités de calcium dans la mitochondrie se produit dans différentes conditions pathophysiologiques et peut déjà à elle seule induire de l'apoptose (Hajnóczky *et al.*, 2006). Ainsi, lorsqu'un processus délétère pour la cellule induit une perte de l'équilibre homéostatique entre l'influx et l'efflux de calcium au niveau de la membrane cytoplasmique, il s'en suit une élévation de la concentration de calcium cytosolique qui va se répercuter sur la concentration de calcium mitochondrial (Hajnóczky *et al.*, 2006). La mitochondrie possède des mécanismes de régulation de son homéostasie calcique mais lorsqu'une forte quantité de calcium est brusquement accumulée dans le cytoplasme et se transmet dans la matrice mitochondriale, ces mécanismes régulateurs peuvent être dépassés. Le calcium peut alors interagir avec la cyclophiline D pour induire l'ouverture de pores PTP (*Permeability Transition Pore*) qui traversent à la fois les membranes mitochondriales interne et externe et permettent le passage de calcium, d'autres ions et de petites molécules (Hajnóczky *et al.*, 2006). De plus, l'augmentation de la concentration en calcium mitochondrial stimule aussi la synthèse de dérivés toxiques de l'oxygène qui participent à leur tour à l'ouverture des pores PTP qui va causer la dissipation du $\Delta\Psi_m$ et la libération du calcium. Si la surcharge en calcium cytoplasmique persiste (ce qui doit être le cas avec les toxines RTX), le PTP reste ouvert et permet l'accumulation de solutés dans la matrice mitochondriale, aboutissant à l'expansion de l'espace matriciel et à la rupture de la membrane mitochondriale externe tout en libérant le contenu de l'espace intermembranaire dont le cytochrome C (Hajnóczky *et al.*, 2006). Finalement, l'atteinte de la fonction mitochondriale et l'activation de mécanismes cytoplasmiques par les facteurs mitochondriaux libérés mènent à l'exécution de la cellule par apoptose. Atapattu et ses collaborateurs ont d'ailleurs démontré tout récemment que la LktA internalisée pouvait exercer une action cytotoxique directe sur la mitochondrie en liant la membrane mitochondriale externe et en provoquant l'effondrement du potentiel membranaire $\Delta\Psi_m$ et la libération du cytochrome C dans le cytosol (Atapattu *et al.*, 2008). Ces effets de la toxine ont ensuite été antagonisés par la cyclosporine, un stabilisateur de la membrane mitochondriale

(Atapattu *et al.*, 2008). La LktA serait aussi capable de lier la cyclophiline D (Atapattu *et al.*, 2008).

Formation de pores

Par ailleurs, l'appartenance de la LktA à la famille des toxines RTX sous-entend qu'elle puisse induire la cytolysse via la formation de pores entraînant un efflux de K^+ , un influx de Ca^{2+} , un gonflement osmotique colloïdal et éventuellement la lyse cellulaire. La taille du pore varie selon les toxines de 0,6-1 nm (dans le cas de la LktA) (Clinkenbeard *et al.*, 1989a ; Iwase *et al.*, 1990 ; Ehrmann *et al.*, 1991) à 2-3 nm de diamètre (Bhakdi *et al.*, 1986; Lalonde *et al.*, 1989). Le mécanisme de formation du pore lui-même n'a pas encore été décrit mais peut être approché théoriquement en fonction de ce qui est connu pour d'autres toxines RTX. Ainsi, il ne faut que quelques secondes à la LtxA d'*A. actinomycetemcomitans* (en hautes concentrations) pour induire une forte conductance et des changements morphologiques à des cellules HL-60 humaines d'origine lymphoblastique, alors qu'aucun effet n'est observé lorsque la LtxA est ajoutée à une bicouche artificielle, sauf si la toxine est ajoutée à la monocouche lipidique avant la formation de la bicouche. Ceci peut être expliqué par le fait que la forme hydrosoluble de la toxine ne s'incorpore pas spontanément dans une bicouche mais que si elle est partiellement dénaturée comme c'est le cas à l'interface monocouche lipidique-eau, l'insertion a lieu et les pores sont formés. Ceci expliquerait également la nécessité pour ces toxines d'interagir avec un récepteur de surface comme le LFA-1 (Lear *et al.*, 1995 ; Lally *et al.*, 1997 ; Karakelian *et al.*, 1998). De même, l'étude du mode d'action de l'hémolysine HlyA d'*E. coli* (Menestrina *et al.*, 1987 ; Menestrina, 1988 ; Benz *et al.*, 1989 ; Ludwig *et al.*, 1991) suggère la nécessité d'un récepteur pour un processus en deux étapes où la liaison à la cellule-cible nécessiterait les répétitions riches en glycines et l'acylation de la toxine alors que les régions hydrophobes N-terminales permettraient la formation du pore (Coote, 1992). La spécificité de la cellule-cible serait dès lors due soit à une liaison spécifique au récepteur, soit à la capacité de la toxine à interagir avec la membrane ou encore aux deux phénomènes. Enfin, il a été montré que l'hémolysine, dans des conditions

conduisant à la cytolysse, s'insérerait dans la membrane-cible à la façon des protéines intrinsèques ou intégrales en n'occupant qu'une seule monocouche. En conséquence, l'insertion d'une ou plusieurs molécules de toxine induirait une augmentation de la pression latérale qui à terme entraînerait une fracture de la membrane (Soloaga *et al.*, 1999).

4. Perspectives

4.1. Inventaire de la variation génétique spontanée du CD18

L'identification du motif précis de liaison de la leucotoxine sur le CD18 permettrait la mise en œuvre (i) d'un inventaire de la variation génétique spontanée présente dans les races viandeuses Blanc Bleu Belge et internationales au niveau dudit motif et (ii) d'un service de génotypage avec pour but d'éliminer certains taureaux d'insémination artificielle et/ou de proposer une tactique d'accouplement préférentielle permettant de disséminer le plus rapidement possible un trait de résistance innée à la mannheimiose au sein des populations bovines belge et internationale. Si à première vue, il semble peu probable que la variation intra *Bos taurus* soit supérieure à la variation inter-ruminants, l'exemple du mouflon canadien (*Bighorn sheep*, *Ovis canadensis*) dont les polymorphonucléaires sont quatre à huit fois plus sensibles à la leucotoxine que ceux du mouton domestique (*Ovis aries*) (Silflow et Foreyt, 1994), alors que leurs CD18 présentent 99 % d'identité (Liu *et al.*, 2006), nous donne à penser que cette piste vaut néanmoins la peine d'être explorée.

4.2. Chimiothérapie

Cibler et inhiber l'interaction spécifique entre la leucotoxine de *Mannheimia haemolytica* et la sous-unité CD18 des ruminants constituerait également une stratégie de choix pour lutter contre la mannheimiose sans recourir systématiquement à l'administration massive d'antibiotiques. Ainsi, l'élaboration d'un jeu de peptides compétiteurs du LFA-1 pour la fixation à la leucotoxine, c'est-à-dire qui seraient inhibiteurs de son activité leucotoxique *in vitro* et de la virulence de *M. haemolytica* *in vivo*, permettrait de proposer un peptide thérapeutique injectable à substituer aux traitements antibiotiques ne générant ni résidus

ni antibiorésistance et fonctionnant à la manière d'un leurre pour la leucotoxine. Nous pouvons aussi nous inspirer des nombreuses recherches menées sur le récepteur LFA-1, qui de par sa contribution active aux interactions moléculaires complexes responsables de nombreuses fonctions normales et pathologiques du système immunitaire, se retrouve à l'origine de nombreuses maladies d'étiologies diverses (génétique, bactérienne, virale, néoplasique, allergique et auto-immune), avec des impacts divers sur les santés humaine et animale (Zecchinon *et al.*, 2006c). De l'étude intensive de son interaction avec son principal ligand CD54 ou *ICAM-1* (*intercellular adhesion molecule-1*) furent en effet développés, à but thérapeutique, des anticorps, des peptides, des peptidomimétiques et des petites molécules inhibitrices (Zecchinon *et al.*, 2006b).

Bien que l'efficacité de certains anticorps ait été clairement démontrée, leur utilisation ainsi que celle de peptides en tant qu'agents thérapeutiques présentent un certain nombre de défis pharmaceutiques dus à leurs propriétés physico-chimiques : ils sont difficilement délivrables oralement, sont coûteux à produire et enclins à la dégradation physique ou chimique, sont rapidement éliminés par voie hépatique ou rénale, et peuvent également générer de l'immunogénicité lors d'injections répétées (Anderson et Siahaan, 2003). En élevage bovin, une administration d'anticorps par intraveineuse paraît néanmoins tout à fait plausible, d'autant qu'il est connu que ceux-ci peuvent passer la barrière alvéolo-capillaire pour se retrouver au niveau des lobes antéro-ventraux colonisés par *M. haemolytica*, mais il faudrait, pour ce faire, plutôt identifier le motif d'interaction de la leucotoxine et non pas celui situé sur le CD18.

Le développement de peptidomimétiques, des mimes pseudopeptidiques ou non peptidiques de peptides biologiquement actifs, adaptés à l'usage thérapeutique (Gante, 1994), permettrait par ailleurs d'apporter une solution à l'identification d'un motif de liaison non linéaire, comme l'atteste le développement d'inhibiteurs peptidomimétiques de l'interaction ICAM-1/LFA-1, résultant du transfert d'un épitope non linéaire (identifié au niveau du domaine 1 d'ICAM-1 comme étant essentiel pour l'interaction avec LFA-1), à une trame moléculaire non pep-

tidique (*small-molecule framework*), supposée surmonter les limitations pharmaceutiques de peptides et en particulier leur délivrance inefficace par voie orale (Fisher *et al.*, 1997 ; Casanovas *et al.*, 1998 ; Gadek *et al.*, 2002). Les antagonistes se lient au LFA-1, inhibent la liaison d'ICAM-1 aux leucocytes aussi bien que la réaction mixte lymphocytaire et exhibent, par comparaison à un anticorps anti-LFA-1, des effets anti-inflammatoires significatifs *in vivo*. La réalisation d'études de relation structure-activité conduisit par ailleurs au développement de deux molécules plus puissantes (Burdick *et al.*, 2003 ; Burdick *et al.*, 2004).

Quant aux petites molécules inhibitrices du LFA-1, deux classes mécanistiques distinctes, dénommées antagonistes allostériques α I et α / β I-like, ont récemment été développées, avec des effets opposés sur la conformation, et donc l'activation, de l'intégrine (Shimaoka et Springer, 2004 ; Zecchinon *et al.*, 2006b). Il nous semble assez difficile d'obtenir, par cette voie, des résultats spécifiques de la mannheimiose puisqu'une action au niveau de la conformation de l'intégrine aura automatiquement des répercussions sur ses fonctions « physiologiques ».

Des glucoconjugués solubles arborant les glycanes que lie la toxine sur le récepteur β_2 -intégrine (*N,N'*-diacétylchitobiose, *N,N',N''*-triacétylchitotriose, D-mannose, *N*-acétyllactosamine et acide sialique (Morova *et al.*, 2008)) pourraient aussi être produits. Ces dernières années, les progrès qui ont été fait dans la synthèse enzymatique *in vitro* des glycanes ont permis de complexer ces oligosaccharides à la mucine ou, en très grand nombre, dans des structures synthétiques appelées glycodendromères. Ces molécules pourraient être administrés à l'animal (Roy, 2003 ; Tanaka *et al.*, 2008 ; Varki et Sharon, 2008 ; Wang, 2008) ; confrontés à la toxine, ils agiraient comme des leurres inhibant sa liaison au récepteur en écartant le développement de l'effet cytotoxique (Touaibia et Roy, 2007), à l'image des résultats obtenus par l'équipe de Morova et collaborateurs (Zhao *et al.*, 2008). De tels composés ont déjà été utilisés pour neutraliser d'autres facteurs de virulence bactériens (Imberty *et al.*, 2008).

Enfin, une dernière catégorie d'agents

inhibiteurs qui pourrait être développée contre la toxine ou la sous-unité CD18 sont de courtes séquences d'acides nucléiques appelées aptamères. Ces molécules sont généralement créées au terme de plusieurs cycles de sélection réalisés *in vitro* (*SELEX*, *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) au sein d'un énorme pool de séquences nucléiques aléatoires mis en présence de la cible moléculaire que l'on cherche à lier et inhiber (Kaur et Roy, 2008 ; Shamah *et al.*, 2008). Les aptamères offrent des avantages sur les anticorps puisque leur synthèse peut se dérouler entièrement *in vitro*, ils possèdent des propriétés de stockage intéressantes et stimulent peu ou pas du tout le système immunitaire (Kaur et Roy, 2008). Par ailleurs, ils ont la capacité de lier le récepteur ou la toxine quelle que soit la nature des sites d'interaction en jeu (peptidique, saccharidique ou lipidique). Il est aussi possible d'envisager d'inhiber l'activation des voies de signalisation intracellulaires par la LktA et par là son action cytotoxique. Ainsi, des aptamères ont par exemple été sélectionnés contre la queue cytoplasmique du CD18 en vue d'inhiber l'adhésion cellulaire à ICAM-1 (Blind *et al.*, 1999 ; Famulok *et al.*, 2001). De même, des aptamères sélectionnés contre la cytohesine-1, un facteur d'échange de nucléotide guanine qui régulerait l'adhésion du LFA-1 à ICAM-1, et exprimés intracellulairement, bloquent la fonction de cette molécule, provoquent un réarrangement du cytosquelette d'actine et inhibent l'activité du LFA-1 dans l'adhésion leucocytaire (Famulok *et al.*, 2001 ; Mayer *et al.*, 2001). Ces aptamères peuvent donc potentiellement inhiber l'action de la LktA et il serait intéressant de les faire exprimer par les leucocytes bovins lors de la mannheimiose. Leur synthèse pourrait s'inspirer de la technique que Blind et collaborateurs (1999) ont utilisé pour les produire dans des lymphocytes T humains : l'expression contrôlée de l'aptamère par l'ARN polymérase T7 via l'infection par des poxvirus vaccinaux recombinants incapables de se propager (Famulok *et al.*, 2001).

Bien entendu, à l'image de l'utilisation des antibiotiques dans cette maladie, ces médicaments devraient être administrés le plus rapidement possible après l'infection et idéalement avant même que les signes cliniques n'apparaissent, ce qui n'est pas réalisable en

pratique. Toutefois, si ces molécules sont administrées suffisamment tôt au cours de la maladie, elle permettraient de limiter sérieusement le développement des lésions et seraient donc un complément intéressant à l'antibiothérapie et à la vaccination qui n'apportent en général qu'une diminution de la mortalité et de la morbidité lors de l'infection de l'élevage. Cette vitesse d'action impose aussi l'utilisation d'un médicament qui puisse être administré facilement et dont le principe actif diffuse rapidement dans le système circulatoire et respiratoire. Enfin, l'utilisation de substances inhibant l'extravasation leucocytaire n'est pas envisageable sur de longues périodes ou lors d'une infection concomitante avec un autre agent pathogène. Leur administration devrait être ponctuelle car le gain qu'elles apportent dans la mannheimiose pourrait être contrebalancé par le fait qu'elles affaiblissent le système immunitaire et sensibilisent donc l'animal aux autres infections. Par ailleurs, en comparaison des mammifères, le pouvoir évolutif générationnel des bactéries (vitesse de production des générations, transfert et plasticité génétique...) est très important. Ainsi, l'utilisation intensive des antibiotiques dans des conditions de pression d'infection élevée, sans pratiques prophylactiques adéquates, a abouti à l'apparition d'antibiorésistances bactériennes. De la même façon, les propositions thérapeutiques qui sont faites ici peuvent ne pas être infaillibles et, si elles ne sont pas intégrées dans un programme prophylactique drastique, risquent d'être très vite dépassées par la capacité d'adaptation des bactéries.

4.3. Transgénèse

Dans le cas où l'inventaire de la variation génétique spontanée présente dans les races viandeuses Blanc Bleu Belge et internationales au niveau du motif précis de liaison de la leucotoxine sur le CD18 ne donne aucun résultat concluant, il serait possible d'envisager d'engager un processus d'ingénierie génétique visant à corriger par transgénèse la séquence responsable de la sensibilité des ruminants à la leucotoxine de *Mannheimia haemolytica*.

En effet, la transgénèse animale est une technologie qui permet le transfert stable d'une information génétique connue dans un génome donné de manière plus précise que la sélection

conventionnelle. Depuis ses débuts en 1980, elle ne fait que prendre de l'importance, grâce notamment aux récentes avancées techniques et aux découvertes de gènes d'intérêt facilités par le séquençage des génomes des animaux d'élevage. De plus, la taille de l'ADN étranger n'est plus un problème puisqu'il est maintenant possible d'insérer des vecteurs microchromosomiques stables porteurs de millions de paires de bases d'ADN, contenant un centromère, deux télomères et des origines de réplifications (Kuroiwa *et al.*, 2002). Ses applications peuvent être divisées en trois grandes catégories : (i) l'obtention d'informations sur la fonction et la régulation des gènes, que ce soit dans un contexte normal ou pathologique, (ii) l'obtention de produits de haute valeur destinés à la thérapie humaine comme des protéines recombinantes à vocation pharmaceutique et des xéno-organes pour humains et (iii) l'amélioration des produits animaux de consommation (Houdebine, 2005), tels ces poissons transgéniques de diverses espèces (saumon, truite, tilapia, carpe...) qui contiennent plusieurs copies du gène de la somatotropine et qui présentent donc une croissance plus rapide (Muir, 2004). Les Nations-Unies recommandent même l'implémentation de l'approche transgénique pour améliorer la santé des pays en voie de développement, bien que cette exhortation ne concerne principalement pour l'instant que les cultures (Acharya *et al.*, 2003).

La lutte contre les pathologies animales apparaît également comme un secteur prioritaire puisque la sélection d'animaux transgéniques plus résistants pourrait théoriquement permettre (i) de réduire l'usage de médicaments dont les antibiotiques, (ii) d'accroître le bien-être animal, (iii) de faciliter le travail de l'éleveur, (iv) de diminuer les coûts via l'amélioration du rendement en élevage et (v) d'amoindrir la fréquence de transmission des maladies de l'animal à l'Homme (Houdebine, 2005). Ainsi, par exemple, (i) des bovins chez qui les gènes PrP ont été inactivés par recombinaison homologue (Kuroiwa *et al.*, 2004) sont résistants à la propagation du prion *in vitro*, tout en étant à 20 mois, normaux des points de vue clinique, physiologique, histopathologique, immunologique et reproductif (Richt *et al.*, 2007) et (ii) divers animaux secrètent dans leur lait des molécules exhibant des proprié-

tés antibactériennes (Zuelke, 1998); (Mitra *et al.*, 2003 ; Donovan *et al.*, 2005 ; Wall *et al.*, 2005 ; Maga *et al.*, 2006) ou antivirales (Castilla *et al.*, 1998a ; Castilla *et al.*, 1998b ; Sola *et al.*, 1998), supposées protéger à la fois les consommateurs et les glandes mammaires contre les infections (Soler *et al.*, 2006).

Du point de vue pratique, la transgénèse doit cependant faire face à différents défis : la sélection du gène à ajouter, substituer ou neutraliser, la construction de vecteurs permettant une expression fiable du transgène, le transfert et l'intégration de celui-ci et enfin, l'interprétation des données. Par ailleurs, le transfert de gènes reste peu efficace dans certaines espèces et peut induire des effets secondaires imprévisibles dus à l'interférence du transgène avec le génome de l'hôte au niveau du site d'insertion ou par l'interaction de l'ARN ou de la protéine correspondante avec les mécanismes cellulaires (Houdebine, 2005 ; Houdebine, 2007). De plus, au-delà des problèmes éthiques posés (notamment la manipulation des embryons), si la reproduction par clonage supprime certains des problèmes qui accompagnent la reproduction sexuée (notamment en terme de sélection d'animaux « naturellement » plus résistants à certaines pathologies), elle en engendre d'autres (Houdebine, 2005 ; Houdebine et Renard, 2005 ; Houdebine, 2007 ; Robl *et al.*, 2007) : (i) le patrimoine génétique des cellules donneuses de noyau n'est pas strictement connu, (ii) le statut génétique des clones ne l'est pas d'avantage, (iii) la reprogrammation du génome des cellules donneuses de noyau par le cytoplasme de l'ovocyte est fréquemment incomplète, (iv) les animaux obtenus par clonage, bien qu'essentiellement génétiquement identiques à leurs géniteurs, sont souvent épigénétiquement modifiés sans que l'on puisse en prévoir les effets, (v) le clonage peut être, si l'on n'y prend garde, réducteur de biodiversité et accentuer les effets indésirables de la sélection moderne qui repose sur un nombre de plus en plus restreint de géniteurs, (vi) l'introduction d'un gène dans un génome animal peut réactiver un transposon ou un génome rétroviral intégré et induire ainsi une multiplication du transposon ou la production de particules virales infectieuses potentiellement pathogènes et (vii) les effets directs et indirects des transgènes ne peuvent être tous prévisibles (ce qui quelque part

fait leur charme pour les généticiens) et il n'est pas exclu que les animaux transgéniques deviennent plus sensibles à certaines maladies, le système immunitaire des clones étant souvent imparfaitement fonctionnel (Ellis, 2004). Par contre, certaines anomalies observées peuvent être abolies par la reproduction sexuée, celle-ci étant capable d'éliminer les gamètes anormaux et de parfaire la reprogrammation des génomes. Ainsi, les télomères anormalement courts chez certains clones retrouvent une longueur normale chez tous les descendants (Shiels et Jardine, 2003).

Des mesures de confinement spécifiques sont aussi nécessaires pour permettre l'élevage de ces animaux dans des conditions de sécurité élevée et éviter tout risque de dissémination involontaire dans la chaîne alimentaire humaine, l'alimentation du bétail ou l'environnement, même si la transmissibilité à l'Homme de certaines toxines ou la dissémination incontrôlée du transgène semblent moins probables que ce qui est observé chez les végétaux (Houdebine et Renard, 2005). Par ailleurs, le coût des animaux transgéniques de rente reste élevé, principalement du fait que la dissémination des traits d'intérêt porté par un transgène n'est pas aussi simple et rapide que pour les plantes et que les transgènes doivent être source d'un très haut profit potentiel pour être utilisables. Quoiqu'il en soit, des tests permettent d'évaluer la toxicité, l'allergénicité et l'infériorité des animaux obtenus par clonage ou transgénèse (risques auxquels n'échappent d'ailleurs pas les animaux issus de la sélection classique) et, jusqu'à ce jour, la littérature scientifique ne relate aucun effet négatif, que ce soit en termes de composition globale du lait ou de la viande, de digestibilité, de toxicité et d'alimentarité, d'allergénicité, de mutagénicité ou de présence de particules rétrovirales (Houdebine et Renard, 2005).

5. CONCLUSION

Les caractères de résistance innée aux maladies ont été, depuis des millénaires, largement disséminés dans les populations animales grâce à la sélection naturelle, ne favorisant la survie que d'individus résistants à telle ou telle maladie. La domestication a, quant à elle, fait intervenir un élément neuf, à savoir la sélection artificielle de caractères rela-

tifs aux productions. Concomitamment, les conditions d'élevage ont évolué vers un système concentrationnaire où l'extrême densité des populations animales a fourni aux agents pathogènes une niche infiniment plus propice à la contagion. Le résultat est que les populations animales n'ont jamais été soumises à des pressions d'infection plus intenses que celles qui prévalent aujourd'hui, tout en comptant progressivement moins d'individus résistants, à mesure que la pression de sélection s'exerce unilatéralement en faveur des productions. Une des conséquences en est le recours à l'administration massive d'antibiotiques, avec les répercussions que l'on connaît sur l'émergence de souches multi résistantes (Ferber, 2000 ; Angulo *et al.*, 2004 ; Molbak, 2004). Identifier des critères permettant de restaurer une pression de sélection favorable à la dissémination la plus large possible de traits de résistance aux maladies va donc dans le sens d'un renforcement de l'autonomie et du profit des éleveurs, rendus moins dépendants des substances médicamenteuses, des retards de croissance et des saisies à l'abattage mais rencontre également le souci du consommateur de disposer d'une alimentation pécuniairement abordable, saine et sans résidus.

De ce qui précède, il ressort qu'une des priorités de la recherche dans une discipline comme la pathologie vétérinaire est l'étude des maladies qui touchent les animaux de rente, comme les pneumonies bactériennes à *Mannheimia haemolytica* qui constituent un problème majeur dans l'élevage et l'engraissement des bovins, avec des répercussions très élevées en termes de morbidité et de mortalité. Parmi les différents facteurs de virulence produits par la bactérie, la leucotoxine joue un rôle de tout premier plan puisqu'elle est responsable de la spécificité d'espèces qu'exhibe *M. haemolytica* envers les ruminants en provoquant la lyse de leurs leucocytes et ce, via une interaction spécifique avec la sous-unité CD18 de leurs β_2 -intégrines (Ambagala *et al.*, 1999 ; Li *et al.*, 1999 ; Jeyaseelan *et al.*, 2000 ; Deshpande *et al.*, 2002 ; Jeyaseelan *et al.*, 2002 ; Dileepan *et al.*, 2005b ; Zecchinon *et al.*, 2005 ; Fett *et al.*, 2008). L'identification du ou des motif(s) moléculaire(s) du CD18 qui confère(nt) aux ruminants une sensibilité spécifique à la leucotoxine pourrait être valorisée de multiples façons : sélection assistée par marqueurs au sein de la population bovine mondiale après inventaire de la variation génétique spontanée au niveau dudit motif,

développement de molécules à usage thérapeutique (anticorps, peptides, peptidomimétiques, inhibiteurs allostériques, glucoconjugués, aptamères...) ou encore mise en place d'une stratégie de transgénèse.

En conclusion, la mise en évidence de ce(s) motif(s) représente donc le challenge majeur de cette recherche, d'autant plus que les récentes avancées semblaient jusqu'il y a peu se contredire.

Financement

P. Vanden Bergh a bénéficié d'une bourse du Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture, rue d'Egmont 5, B-1000 Bruxelles.

Mannheimiosis: from a (molecular) fatal attraction to one of the most important ruminant breeding disease

Summary

Bacterial pneumonias represent the major problem in ruminant breeding and fattening, with high morbidity and mortality levels. Besides the several biological factors incriminated, *Mannheimia haemolytica* plays a great role as a complicating agent.

One of its features is the fact that it does not lead to broncho-alveolar fibrino-haemorrhagic pneumonias in non-ruminant species. Lesions result from massive necrosis of neutrophils and macrophages and from the release of their constituents. At the molecular level, this specificity is due to the tight interaction between leukotoxin, the major bacterial virulence factor, and the CD18 subunit of the leukocytic surface receptors β_2 -integrins.

The review describes the consequences of this binding at the macroscopic and microscopic levels and starts up a few therapeutic perspectives based on recent research findings.

BIBLIOGRAPHIE

- ACHARYA T., DAAR A.S., SINGER P.A. Biotechnology and the UN's Millennium Development Goals. *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**, 1434-1436.
- AL-GHAMDI G.M., AMES T.R., BAKER J.C., WALKER R., CHASE C.C., FRANK G.H., MAHESWARANS.K. Serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolates from the upper Midwest United States. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2000, **12**, 576-578.
- AMBAGALA T.C., AMBAGALA A.P., SRIKUMARAN S. The leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* binds to beta(2) integrins on bovine leukocytes. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999, **179**, 161-167.
- ANDERSON M.E., SIAHAAN T.J. Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors. *Peptides*, 2003, **24**, 487-501.
- ANGELOS J.A., BALL L.M., HESS J.F. Identification and characterization of complete RTX operons in *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*. *Vet. Microbiol.*, 2007, **125**, 73-79.
- ANGEN O., MUTTERS R., CAUGANT D.A., OLSEN J.E., BISGAARD M. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, **49**, 67-86.
- ANGULO F.J., NARGUND V.N., CHILLER T.C. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*, 2004, **51**, 374-379.
- ASADA M., FURUKAWA K., KANTOR C., GAHMBERG C.G., KOBATA A. Structural study of the sugar chains of human leukocyte cell adhesion molecules CD11/CD18. *Biochemistry*, 1991, **30**, 1561-1571.
- ATAPATTU D.N., ALBRECHT R.M., MCCLENAHAN D.J., CZUPRYNSKI C.J. Dynamin-2-dependent targeting of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin to mitochondrial cyclophilin D in bovine lymphoblastoid cells. *Infect. Immun.*, 2008, **76**, 5357-5365.
- ATAPATTU D.N., CZUPRYNSKI C.J. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin induces apoptosis of bovine lymphoblastoid cells (BL-3) via a caspase-9-dependent mitochondrial pathway. *Infect. Immun.*, 2005, **73**, 5504-5513.
- ATAPATTU D.N., CZUPRYNSKI C.J. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin binds to lipid rafts in bovine lymphoblastoid cells and is internalized in a dynamin-2- and clathrin-dependent manner. *Infect. Immun.*, 2007, **75**, 4719-4727.
- BAILLY P., TONTTI E., HERMAND P., CARTRON J.P., GAHMBERG C.G. The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. *Eur. J. Immunol.*, 1995, **25**, 3316-3320.
- BECKER D.J., LOWE J.B. Leukocyte adhesion deficiency type II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, **1455**, 193-204.
- BENZ R., SCHMID A., WAGNER W., GOEBEL W. Pore formation by the *Escherichia coli* hemolysin: evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates. *Infect. Immun.*, 1989, **57**, 887-895.
- BERMAN A.E., KOZLOVA N.I., MOROZEVICH G.E. Integrins: structure and signaling. *Biochemistry (Mosc.)*, 2003, **68**, 1284-1299.
- BERTHOUD H., FREY J., KUHNERT P. Characterization of Aqx and its operon: the hemolytic RTX determinant of *Actinobacillus equuli*. *Vet. Microbiol.*, 2002, **87**, 159-174.
- BHAKDI S., MACKMAN N., NICAUD J.M., HOLLAND I.B. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect. Immun.*, 1986, **52**, 63-69.
- BINGHAM D.P., MOORE R., RICHARDS A.B. Comparison of DNA: DNA homology and enzymatic activity between *Pasteurella haemolytica* and related species. *Am. J. Vet. Res.*, 1990, **51**, 1161-1166.
- BLIND M., KOLANUS W., FAMULOK M. Cytoplasmic RNA modulators of an inside-out signal-transduction cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, **96**, 3606-3610.
- BREIDER M.A., WALKER R.D., HOPKINS F.M., SCHULTZ T.W., BOWERSOCK T.L. Pulmonary lesions induced by *Pasteurella haemolytica* in neutrophil sufficient and neutrophil deficient calves. *Can. J. Vet. Res.*, 1988, **52**, 205-209.
- BURDICK D.J., MARSTERS J.C., JR., ALIAGAS-MARTIN I., STANLEY M., BERESINI M., CLARK K., MCDOWELL R.S., GADEK T.R. N-Benzoyl amino acids as ICAM/LFA-1 inhibitors. Part 2: structure-activity relationship of the benzoyl moiety. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, **14**, 2055-2059.
- BURDICK D.J., PARIS K., WEESE K., STANLEY M., BERESINI M., CLARK K., MCDOWELL R.S., MARSTERS J.C., GADEK T.R. N-Benzoyl amino acids as LFA-1/ICAM inhibitors 1: amino acid structure-activity relationship. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 1015-1018.
- BUREAU F., DETILLEUX J., DORTS T., UYSTEPRUYST C., COGHE J., LEROY P.L., LEKEUX P. Spirometric performance in Belgian Blue calves: I. Effects on economic losses due to the bovine respiratory disease complex. *J. Anim. Sci.*, 2001, **79**, 1301-1304.
- BURROWS L.L., LO R.Y. Molecular characterization of an RTX toxin determinant from *Actinobacillus suis*. *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 2166-2173.

- CAPRIOLIA., BUSANIL., MARTEL J.L., HELMUTH R. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2000, **14**, 295-301.
- CASASNOVAS J.M., STEHLE T., LIU J.H., WANG J.H., SPRINGER T.A. A dimeric crystal structure for the N-terminal two domains of intercellular adhesion molecule-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, **95**, 4134-4139.
- CASTILLA J., PINTADO B., SOLA I., SANCHEZ-MORGADO J.M., ENJUANES L. Engineering passive immunity in transgenic mice secreting virus-neutralizing antibodies in milk. *Nat. Biotechnol.*, 1998a, **16**, 349-354.
- CASTILLA J., SOLA I., PINTADO B., SANCHEZ-MORGADO J.M., ENJUANES L. Lactogenic immunity in transgenic mice producing recombinant antibodies neutralizing coronavirus. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1998b, **440**, 675-686.
- CHANG Y.F., MA D.P., SHI J., CHENGAPPA M.M. Molecular characterization of a leukotoxin gene from a *Pasteurella haemolytica*-like organism, encoding a new member of the RTX toxin family. *Infect. Immun.*, 1993a, **61**, 2089-2095.
- CHANG Y.F., SHI J., MA D.P., SHIN S.J., LEIN D.H. Molecular analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxin-III gene cluster. *DNA Cell. Biol.*, 1993b, **12**, 351-362.
- CHIEN M.S., CHAN Y.Y., CHEN Z.W., WU C.M., LIAO J.W., CHEN T.H., LEE W.C., YEH K.S., HSUAN S.L. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 derived ApxI induces apoptosis in porcine alveolar macrophages. *Vet. Microbiol.*, 2009, **135**, 327-333.
- CLINKENBEARD K.D., CLARKE C.R., HAGUE C.M., CLINKENBEARD P., SRIKUMARAN S., MORTON R.J. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced synthesis of eicosanoids by bovine neutrophils in vitro. *J. Leukoc. Biol.*, 1994, **56**, 644-649.
- CLINKENBEARD K.D., MOSIER D.A., CONFER A.W. Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect. Immun.*, 1989a, **57**, 420-425.
- CLINKENBEARD K.D., MOSIER D.A., TIMKO A.L., Confer A.W. Effects of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin on cultured bovine lymphoma cells. *Am. J. Vet. Res.*, 1989b, **50**, 271-275.
- CONFER A.W., PANCIERA R.J., CLINKENBEARD K.D., MOSIER D.A. Molecular aspects of virulence of *Pasteurella haemolytica*. *Can. J. Vet. Res.*, 1990, **54**, S48-52.
- COOTE J.G. Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1992, **8**, 137-161.
- COX E., MAST J., MACHUGH N., SCHWENGER B., GODDEERIS B.M. Expression of beta 2 integrins on blood leukocytes of cows with or without bovine leukocyte adhesion deficiency. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1997, **58**, 249-263.
- CUDDL.A., OWNBY C.L., CLARKE C.R., SUN Y., CLINKENBEARD K.D. Effects of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin on apoptosis and oncosis of bovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.*, 2001, **62**, 136-141.
- CZUPRYNSKI C.J., NOEL E.J., ORTIZ-CARRANZA O., SRIKUMARAN S. Activation of bovine neutrophils by partially purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect. Immun.*, 1991, **59**, 3126-3133.
- DASSANAYAKE R.P., SHANTHALINGAM S., DAVIS W.C., SRIKUMARAN S. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis of ovine (*Ovis aries*) leukocytes is mediated by CD18, the beta subunit of beta(2)-integrins. *Microb. Pathog.*, 2007, **42**, 167-173.
- DAVIES R.L., BAILLIE S. Cytotoxic activity of *Mannheimia haemolytica* strains in relation to diversity of the leukotoxin structural gene lktA. *Vet. Microbiol.*, 2003, **92**, 263-279.
- DAVIES R.L., CAMPBELL S., WHITTAM T.S. Mosaic structure and molecular evolution of the leukotoxin operon (lktCABD) in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, and *Pasteurella trehalosi*. *J. Bacteriol.*, 2002, **184**, 266-277.
- DAVIES R.L., DONACHIE W. Intra-specific diversity and host specificity within *Pasteurella haemolytica* based on variation of capsular polysaccharide, lipopolysaccharide and outer-membrane proteins. *Microbiology*, 1996, **142**, 1895-1907.
- DAVIES R.L., WHITTAM T.S., SELANDER R.K. Sequence diversity and molecular evolution of the leukotoxin (lktA) gene in bovine and ovine strains of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *J. Bacteriol.*, 2001, **183**, 1394-1404.
- DESHPANDE M.S., AMBAGALA T.C., AMBAGALA A.P., KEHRLI M.E., JR., SRIKUMARAN S. Bovine CD18 is necessary and sufficient to mediate *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis. *Infect. Immun.*, 2002, **70**, 5058-5064.
- DILEEPAN T., KACHLANY S.C., BALASHOVA N.V., PATEL J., MAHESWARAN S.K. HUMAN CD18 is the functional receptor for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect. Immun.*, 2007a, **75**, 4851-4856.
- DILEEPAN T., KANNAN M.S., WALCHECK B., MAHESWARAN S.K. Integrin-EGF-3 domain of bovine CD18 is critical for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin species-specific susceptibility. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007b, **274**, 67-72.
- DILEEPAN T., KANNAN M.S., WALCHECK B., THUMBIKAT P., MAHESWARAN S.K. Mapping of the binding site for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin within bovine CD18. *Infect. Immun.*, 2005a, **73**, 5233-5237.
- DILEEPAN T., THUMBIKAT P., WALCHECK B., KANNAN M.S., MAHESWARAN S.K.

- Recombinant expression of bovine LFA-1 and characterization of its role as a receptor for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin. *Microb. Pathog.*, 2005b, **38**, 249-257.
- DONACHIE W. Bacteriology of bovine respiratory disease. *U.K. VET.*, 1998, **3**, 44-46.
- DONOVAN D.M., KERR D.E., WALL R.J. Engineering disease resistant cattle. *Transgenic Res.*, 2005, **14**, 563-567.
- DUNGWORTH D. The respiratory system. In : K. Jubb, Kennedy P., Palmer N. (Eds), *Pathology of domestic animals*. Academic Press: San Diego, 1992, 589-663.
- DYER R.M., BENSON C.E., BOY M.G. Production of superoxide anion by bovine pulmonary macrophages challenged with soluble and particulate stimuli. *Am. J. Vet. Res.*, 1985, **46**, 336-341.
- DYKSTRA M., CHERUKURI A., SOHN H.W., TZENG S.J., PIERCE S.K. Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu. Rev. Immunol.*, 2003, **21**, 457-481.
- EDWARDS A.J. Respiratory diseases of feedlot cattle in the central USA. *Bov. Prac.*, 1996, 5-7.
- EGUCHI Y., SHIMIZU S., TSUJIMOTO Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.*, 1997, **57**, 1835-1840.
- EHRMANN I.E., GRAY M.C., GORDON V.M., GRAY L.S., HEWLETT E.L. Hemolytic activity of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *FEBS Lett.*, 1991, **278**, 79-83.
- ELLIS S.A. Immune status: normal expression of MHC class I in the placenta and what is expected in clones. *Cloning Stem Cells*, 2004, **6**, 121-125.
- FAMULOK M., BLIND M., MAYER G. Intramers as promising new tools in functional proteomics. *Chem. Biol.*, 2001, **8**, 931-939.
- FELMLEE T., PELLETT S., WELCH R.A. Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. *J. Bacteriol.*, 1985, **163**, 94-105.
- FERBER D. Antibiotic resistance. Superbugs on the hoof? *Science*, 2000, **288**, 792-794.
- FERECH M., COENEN S., MALHOTRA-KUMAR S., DVORAKOVA K., HENDRICKX E., SUETENS C., GOOSSENS H. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2006, **58**, 401-407.
- FETT T., ZECCHINON L., VANDEN BERGH P., DESMECHT D. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis of caprine (*Capra hircus*) leukocytes is mediated by the CD18 subunit of beta(2)-integrins. *Microb. Pathog.*, 2008, **45**, 337-342.
- FINK S.L., COOKSON B.T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.*, 2005, **73**, 1907-1916.
- FISHER K.L., LU J., RIDDLE L., KIM K.J., PRESTA L.G., BODARY S.C. Identification of the binding site in intercellular adhesion molecule 1 for its receptor, leukocyte function-associated antigen 1. *Mol. Biol. Cell.*, 1997, **8**, 501-515.
- FONG K.P., PACHECO C.M., OTIS L.L., BARANWAL S., KIEBA I.R., HARRISON G., HERSH E.V., BOESZE-BATTAGLIA K., LALLY E.T. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin requires lipid microdomains for target cell cytotoxicity. *Cell. Microbiol.*, 2006, **8**, 1753-1767.
- FRANK G.H., SMITH P.C. Prevalence of *Pasteurella haemolytica* in transported calves. *Am. J. Vet. Res.*, 1983, **44**, 981-985.
- FREY J., MEIER R., GYGI D., NICOLET J. Nucleotide sequence of the hemolysin I gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1991, **59**, 3026-3032.
- GADEK T.R., BURDICK D.J., MCDOWELL R.S., STANLEY M.S., MARSTERS J.C., JR., PARIS K.J., OARE D.A., REYNOLDS M.E., LADNER C., ZIONCHECK K.A., LEE W.P., GRIBLING P., DENNIS M.S., SKELTON N.J., TUMAS D.B., CLARK K.R., KEATING S.M., BERESINI M.H., TILLEY J.W., PRESTA L.G., BODARY S.C. Generation of an LFA-1 antagonist by the transfer of the ICAM-1 immunoregulatory epitope to a small molecule. *Science*, 2002, **295**, 1086-1089.
- GAHMBERG C.G. Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1997, **9**, 643-650.
- GANTE J. Peptidomimetics-tailored enzyme inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1994, **33**, 1699-1720.
- GARDNER B.A., NORTHCUTT S.L., DOLEZAL H.G., GILL D.R., RAY F.K., MORGAN J.B., SHEARHART C.W. Factors influencing profitability of feedlot steers. *Animal Science Research Report, Oklahoma Ag Experiment Station, Oklahoma State University, Stillwater, OK*, 1996, 164-172.
- GERBIG D.G., JR., WALKER R.D., BAKER J.C., FOSTER J.S., MOORE R.N. Calcium ion involvement in the action of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Vet. Microbiol.*, 1989, **19**, 325-335.
- GLASER P., DANCHINA, LADANT D., BARZU O., ULLMANN A. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: the gene and the protein. *Tokai. J. Exp. Clin. Med.*, 1988, **13**, 239-252.
- GOOSSENS H., FERECH M., VANDER STICHELE R., ELSEVIERS M. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet*, 2005, **365**, 579-587.
- GOPINATH R.S., AMBAGALA T.C., DESHPANDE M.S., DONIS R.O., SRIKUMARAN S. *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* Leukotoxin Binding Domain Lies within Amino Acids 1 to 291 of Bovine CD18. *Infect. Immun.*, 2005, **73**, 6179-6182.
- GRIFFIN D. Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 1997, **13**, 367-377.
- GRIFFIN D. Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Calf News Mag.*, 2000, **138**, 19-21.

- GRIFFIN D., PERINO L., WITTUM T. Feedlot respiratory disease: cost, value of preventives and intervention. In : Proceedings of the Twenty Seventh Annual Convention American Association of Bovine Practitioners, Pittsburgh, Pennsylvania, USA, September 22-25, 1994. American Association of Bovine Practitioners : Stillwater, 1995, 157-160.
- HAJNOCZKY G., CSORDAS G., DAS S., GARCIA-PEREZ C., SAOTOME M., SINHA ROY S., YI M. Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca^{2+} uptake in apoptosis. *Cell Calcium*, 2006, **40**, 553-560.
- HAUZENBERGER E., HAUZENBERGER D., HULTENBY K., HOLGERSSON J. Porcine endothelium supports transendothelial migration of human leukocyte subpopulations: anti-porcine vascular cell adhesion molecule antibodies as species-specific blockers of transendothelial monocyte and natural killer cell migration. *Transplantation*, 2000, **69**, 1837-1849.
- HENRICKS P.A., BINKHORST G.J., DRIJVER A.A., NIJKAMP F.P. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin enhances production of leukotriene B₄ and 5-hydroxyeicosatetraenoic acid by bovine polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 3238-3243.
- HESS J.F., ANGELOS J.A. The *Moraxella bovis* RTX toxin locus mbx defines a pathogenicity island. *J. Med. Microbiol.*, 2006, **55**, 443-449.
- HIGHLANDER S., WEINSTOCK G. *Mannheimia haemolytica* PHL213. [en ligne] (08/10/2006) Adresse URL : http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/microbial/microbial-detail.xsp?project_id=122, consulté le 3 avril 2009.
- HIGHLANDER S.K. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (pasteurella) haemolytica*. *Front. Biosci.*, 2001, **6**, 1128-1150.
- HIGHLANDER S.K., FEDOROVA N.D., DUSEK D.M., PANCIERA R., ALVAREZ L.E., RINEHART C. Inactivation of *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin causes partial attenuation of virulence in a calf challenge model. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 3916-3922.
- HOLGERSSON J., EHRNFELT C., HAUZENBERGER E., SERRANDER L. Leukocyte endothelial cell interactions in pig to human organ xenograft rejection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2002, **87**, 407-415.
- HORMANSDORFER S., BAUER J. Resistance pattern of bovine *Pasteurella*. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 1996, **109**, 168-171.
- HOUEBINE L.M. Use of transgenic animals to improve human health and animal production. *Reprod. Domest. Anim.*, 2005, **40**, 269-281.
- HOUEBINE L.M. Transgenic animal models in biomedical research. *Methods Mol. Biol.*, 2007, **360**, 163-202.
- HOUEBINE L.M., RENARD J.P. *Confinement et consommation des animaux clones et transgéniques*. *Rev. Sci. Tech.*, 2005, **24**, 265-274.
- HSUAN S.L., KANNAN M.S., JEYASEELAN S., PRAKASH Y.S., MALAZDREWICH C., ABRAHAMSEN M.S., SIECK G.C., MAHESWARAN S.K. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin and endotoxin induced cytokine gene expression in bovine alveolar macrophages requires NF-kappaB activation and calcium elevation. *Microb. Pathog.*, 1999, **26**, 263-273.
- HSUAN S.L., KANNAN M.S., JEYASEELAN S., PRAKASH Y.S., SIECK G.C., MAHESWARAN S.K. *Pasteurella haemolytica* A1-derived leukotoxin and endotoxin induce intracellular calcium elevation in bovine alveolar macrophages by different signaling pathways. *Infect. Immun.*, 1998, **66**, 2836-2844.
- HUANG C., SPRINGER T.A. Folding of the beta-propeller domain of the integrin alphaL subunit is independent of the I domain and dependent on the beta2 subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, **94**, 3162-3167.
- HYNES R.O. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, 1987, **48**, 549-554.
- HYNES R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 1992, **69**, 11-25.
- IMBERTY A., CHABRE Y.M., ROY R. Glycomimetics and glycodendrimers as high affinity microbial anti-adhesins. *Chemistry*, 2008, **14**, 7490-7499.
- IWASE M., LALLY E.T., BERTHOLD P., KORCHAK H.M., TAICHMAN N.S. Effects of cations and osmotic protectants on cytolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect. Immun.*, 1990, **58**, 1782-1788.
- JENSEN R., PIERSON R.E., BRADDY P.M., SAARI D.A., LAUERMAN L.H., ENGLAND J.J., KEYVANFAR H., COLLIER J.R., HORTON D.P., MCCHESENEY A.E., BENITEZ A., CHRISTIE R.M. Shipping fever pneumonia in yearling feedlot cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1976, **169**, 500-506.
- JEYASEELAN S., HSUAN S.L., KANNAN M.S., WALCHECK B., WANG J.F., KEHRLI M.E., LALLY E.T., SIECK G.C., MAHESWARAN S.K. Lymphocyte function-associated antigen 1 is a receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin in bovine leukocytes. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 72-79.
- JEYASEELAN S., KANNAN M.S., BRIGGS R.E., THUMBIKAT P., MAHESWARAN S.K. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin activates a nonreceptor tyrosine kinase signaling cascade in bovine leukocytes, which induces biological effects. *Infect. Immun.*, 2001a, **69**, 6131-6139.
- JEYASEELAN S., KANNAN M.S., HSUAN S.L., SINGH A.K., WALSETHT.F., MAHESWARAN S.K. *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin-induced cytotoxicity of bovine leukocytes: role of arachidonic acid and its regulation. *Microb. Pathog.*, 2001b, **30**, 59-69.

- JEYASEELAN S., SREEVATSAN S., MAHESWARAN S.K. Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. *Anim. Health Res. Rev.*, 2002, **3**, 69-82.
- JONES F.A. A study of *Bacillus bovisepiscus*. *J. Exp. Med.*, 1921, **34**, 561-577.
- KAEHLER K.L., MARKHAM R.J., MUSCOPLAT C.C., JOHNSON D.W. Evidence of species specificity in the cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica*. *Infect. Immun.*, 1980, **30**, 615-616.
- KAMP E.M., STOCKHOFF-ZURWIEDEN N., VAN LEENGOED L.A., SMITS M.A. Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs. *Infect. Immun.*, 1997, **65**, 4350-4354.
- KAMP E.M., VERMEULEN T.M., SMITS M.A., HAAGSMA J. Production of Apx toxins by field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*. *Infect. Immun.*, 1994, **62**, 4063-4065.
- KARAKELIAN D., LEAR J.D., LALLY E.T., TANAKA J.C. Characterization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin pore formation in HL60 cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1406**, 175-187.
- KAUR G., ROY I. Therapeutic applications of aptamers. *Expert. Opin. Invest. Drugs*, 2008, **17**, 43-60.
- KEHL-FIE T.E., ST GEME J.W., 3RD. Identification and characterization of an RTX toxin in the emerging pathogen *Kingella kingae*. *J. Bacteriol.*, 2007, **189**, 430-6.
- KEHRENBURG C., SCHULZE-TANZI G., MARTEL J.L., DANCLA E.C., SCHWARZ S. Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. *Vet. Res.*, 2001, **32**, 323-339.
- KELK P., JOHANSSON A., CLAESSESON R., HANSTROM L., KALFAS S. Caspase 1 involvement in human monocyte lysis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect. Immun.*, 2003, **71**, 4448-4455.
- KELLY A.P., JANZEN, E.D. A review of morbidity and mortality rates and disease occurrence in North American feedlot cattle. *Can. Vet. J.*, 1986, 496-500.
- KITT T. Über eine experimentelle, der Rinderseuche ähnliche Infektionskrankheit. *Sitzungsber. Ges. Morphol. Physiol. München*, 1885, 140-168.
- KOLODRUBETZ D., DAILEY T., EBERSOLE J., KRAIGE. Cloning and expression of the leukotoxin gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.*, 1989, **57**, 1465-1469.
- KOROSTOFF J., WANG J.F., KIEBA I., MILLER M., SHENKER B.J., LALLY E.T. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin induces apoptosis in HL-60 cells. *Infect. Immun.*, 1998, **66**, 4474-4483.
- KOROSTOFF J., YAMAGUCHI N., MILLER M., KIEBA I., LALLY E.T. Perturbation of mitochondrial structure and function plays a central role in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin-induced apoptosis. *Microb. Pathog.*, 2000, **29**, 267-278.
- KUHNERT P., HEYBERGER-MEYER B., NICOLET J., FREY J. Characterization of PaxA and its operon: a cohemolytic RTX toxin determinant from pathogenic *Pasteurella aerogenes*. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 6-12.
- KUHNERT P., SCHLATTER Y., FREY J. Characterization of the type I secretion system of the RTX toxin ApxII in "*Actinobacillus porcitosillarum*". *Vet. Microbiol.*, 2005, **107**, 225-232.
- KUROIWA Y., KASINATHAN P., CHOI Y.J., NAEEM R., TOMIZUKA K., SULLIVAN E.J., KNOTT J.G., DUTEAU A., GOLDSBY R.A., OSBORNE B.A., ISHIDA I., ROBL J.M. Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin. *Nat. Biotechnol.*, 2002, **20**, 889-894.
- KUROIWA Y., KASINATHAN P., MATSUSHITA H., SATHIYASELAN J., SULLIVAN E.J., KAKITANI M., TOMIZUKA K., ISHIDA I., ROBL J.M. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle. *Nat. Genet.*, 2004, **36**, 775-780.
- LAFLEUR R.L., ABRAHAMSEN M.S., MAHESWARAN S.K. The biphasic mRNA expression pattern of bovine interleukin-8 in *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-stimulated alveolar macrophages is primarily due to tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.*, 1998, **66**, 4087-4092.
- LALLY E.T., GOLUB E.E., KIEBA I.R., TAICHMAN N.S., ROSENBLOOM J., ROSENBLOOM J.C., GIBSON C.W., DEMUTH D.R. Analysis of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin gene. Delineation of unique features and comparison to homologous toxins. *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 15451-15456.
- LALLY E.T., KIEBA I.R., SATO A., GREEN C.L., ROSENBLOOM J., KOROSTOFF J., WANG J.F., SHENKER B.J., ORTLEPP S., ROBINSON M.K., BILLINGS P.C. RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells. *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 30463-30469.
- LALONDE G., MCDONALD T.V., GARDNER P., O'HANLEY P.D. Identification of a hemolysin from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and characterization of its channel properties in planar phospholipid bilayers. *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 13559-13564.
- LAWRENCE P.K., NELSON W.R., LIU W., KNOWLES D.P., FOREYT W.J., SRIKUMARAN S. beta(2) integrin Mac-1 is a receptor for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin on bovine and ovine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2008, **122**, 285-294.
- LEAR J.D., FURBLUR U.G., LALLY E.T., TANAKA J.C. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin forms large conductance, voltage-gated ion channels when incorporated into planar lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, **1238**, 34-41.
- LEKEUX P., AMORY H., DESMECHT D., GUSTIN P., LINDEN A., ROLLIN F. Oxygen transport chain in double-musled blue Belgian cattle. *Br. Vet. J.*, 1994, **150**, 463-471.

- LI J., CLINKENBEARD K.D., RITCHEY J.W. Bovine CD18 identified as a species specific receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Vet. Microbiol.*, 1999, **67**, 91-97.
- LILIE H., HAEHNEL W., RUDOLPH R., BAUMANN U. Folding of a synthetic parallel beta-roll protein. *FEBS Lett.*, 2000, **470**, 173-177.
- LIU W., BRAYTON K.A., DAVIS W.C., MANSFIELD K., LAGERQUIST J., FOREYT W., SRIKUMARAN S. *Mannheimia (pasteurella) haemolytica* leukotoxin utilizes CD18 as its receptor on bighorn sheep leukocytes. *J. Wildl. Dis.*, 2007, **43**, 75-81.
- LIU W., BRAYTON K.A., LAGERQUIST J., FOREYT W.J., SRIKUMARAN S. Cloning and comparison of bighorn sheep CD18 with that of domestic sheep, goats, cattle, humans and mice. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2006, **110**, 11-16.
- LO R.Y. Molecular characterization of cytotoxins produced by *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Pasteurella*. *Can. J. Vet. Res.*, 1990, **54**, S33-35.
- LOPEZ A. Respiratory system, thoracic cavity and pleura. In: Thomson's Special Veterinary Pathology, M. McGavin, W. Carlton et J. Zachary: Saint-Louis Missouri, 2001, 125-196.
- LU C., OXVIG C., SPRINGER T.A. The structure of the beta-propeller domain and C-terminal region of the integrin alphaM subunit. Dependence on beta subunit association and prediction of domains. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 15138-15147.
- LUDWIG A., SCHMID A., BENZ R., GOEBEL W. Mutations affecting pore formation by haemolysin from *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 1991, **226**, 198-208.
- LUO C., WANG K., LIU DE Q., LI Y., ZHAO Q.S. The functional roles of lipid rafts in T cell activation, immune diseases and HIV infection and prevention. *Cell. Mol. Immunol.*, 2008, **5**, 1-7.
- MAGA E.A., CULLOR J.S., SMITH W., ANDERSON G.B., MURRAY J.D. Human lysozyme expressed in the mammary gland of transgenic dairy goats can inhibit the growth of bacteria that cause mastitis and the cold-spoilage of milk. *Foodborne Pathog. Dis.*, 2006, **3**, 384-392.
- MAHESWARAN S.K., WEISS D.J., KANNAN M.S., TOWNSEND E.L., REDDY K.R., WHITELEY L.O., SRIKUMARAN S. Effects of *Pasteurella haemolytica* A1 leukotoxin on bovine neutrophils: degranulation and generation of oxygen-derived free radicals. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1992, **33**, 51-68.
- MANGAN D.F., TAICHMAN N.S., LALLY E.T., WAHL S.M. Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes. *Infect. Immun.*, 1991, **59**, 3267-3272.
- MARTEL J.L., CHASLUS-DANCLA E., COUDERT M., POUMARAT F., LAFONT J.P. Survey of antimicrobial resistance in bacterial isolates from diseased cattle in France. *Microb. Drug Resist.*, 1995, **1**, 273-283.
- MARTIN S.W., MEEK A.H., DAVIS J.A., CURTIS R.A. Factors associated with morbidity and mortality in feedlot cattle calves. The Bruce County Beef Project, year two. *Can. J. Comp. Med.*, 1981, 103-112.
- MAYER G., BLIND M., NAGEL W., BOHM T., KNORR T., JACKSON C.L., KOLANUS W., FAMULOK M. Controlling small guanine-nucleotide-exchange factor function through cytoplasmic RNA intramers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2001, **98**, 4961-4965.
- MENA-ROJAS E., VAZQUEZ CRUZ C., VACA PACHECO S., GARCIA GONZALEZ O., PEREZ-MARQUEZ V.M., PEREZ-MENDEZ A., IBARRA-CABALLERO J., DE LA GARZA M., ZENTENO E., NEGRETE-ABASCAL E. Antigenic secreted proteins from *Haemophilus paragallinarum*. A 110-kDa putative RTX protein. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2004, **232**, 83-87.
- MENESTRINA G. *Escherichia coli* hemolysin permeabilizes small unilamellar vesicles loaded with calcein by a single-hit mechanism. *FEBS Lett.*, 1988, **232**, 217-220.
- MENESTRINA G., MACKMAN N., HOLLAND I.B., BHAKDI S. *Escherichia coli* haemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, **905**, 109-117.
- MITRA A., HRUSKA K.S., WELLNITZ O., KERR D.E., CAPUCO A.V., WALL R.J. EXPRESSION of lysostaphin in milk of transgenic mice affects the growth of neonates. *Transgenic Res.*, 2003, **12**, 597-605.
- MOLBAK K. Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans--the public health consequences. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*, 2004, **51**, 364-369.
- MOROVA J., OSICKA R., MASIN J., SEBOP.RTX cytotoxins recognize beta2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2008, **105**, 5355-5360.
- MORTON R.J., SIMONS K.R., CONFER A.W. Major outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* serovars 1-15: comparison of separation techniques and surface-exposed proteins on selected serovars. *Vet. Microbiol.*, 1996, **51**, 319-330.
- MUGGLI-COCKETT N.E., CUNDIFF L.V., GREGORY K.E. Genetic analysis of bovine respiratory disease in beef calves during the first year of life. *J. Anim. Sci.*, 1992, **70**, 2013-2019.
- MUIR W.M. The threats and benefits of GM fish. *EMBO Rep.*, 2004, **5**, 654-659.
- NCBI TAXONOMY BROWSER *Mannheimia haemolytica* serotype 1. [en ligne] (sans date) Adresse URL :http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=45201&lvl=3&p=mapview&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock, consulté le 3 avril 2009.
- NEWSON I.E., CROSS, F. Some bipolar organisms found in pneumonia in sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1932, **80**, 711-719.
- O'BRIEN J.K., DUFFUS W.P. *Pasteurella haemolytica* cytotoxin: relative susceptibility of bovine

- leucocytes. *Vet. Microbiol.*, 1987, **13**, 321-334.
- OHTA Y., GOTOH M., OHZATO H., FUKUZAKI T., NISHIHARA M., DONO K., UMESHITA K., SAKON M., YAGITA H., OKUMURA K., TANAKA T., KAWASHIMA H., MIYASAKA M., MONDEN M. Direct antigen presentation through binding of donor intercellular adhesion molecule-1 to recipient lymphocyte function-associated antigen-1 molecules in xenograft rejection. *Transplantation*, 1998, **65**, 1094-1100.
- ORTIZ-CARRANZA O., CZUPRYNSKI C.J. Activation of bovine neutrophils by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin is calcium dependent. *J. Leukoc. Biol.*, 1992, **52**, 558-564.
- PERINO L.J. Overview of the bovine respiratory disease complex. *Comp. Cont. Educ. Prac. Vet.*, 1992, 53-56.
- PURDY C.W., RALEIGH R.H., COLLINS J.K., WATTS J.L., STRAUS D.C. Serotyping and enzyme characterization of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolates recovered from pneumonic lungs of stressed feeder calves. *Curr. Microbiol.*, 1997, **34**, 244-249.
- QUIRIE M., DONACHIE W., GILMOUR N.J. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* from cattle. *Vet. Rec.*, 1986, **119**, 93-94.
- RAPPOPORT J.Z., SIMON S.M., BENMERAH A. Understanding living clathrin-coated pits. *Traffic*, 2004, **5**, 327-337.
- RICHT J.A., KASINATHAN P., HAMIR A.N., CASTILLA J., SATHIYASEELAN T., VARGAS F., SATHIYASEELAN J., WU H., MATSUSHITA H., KOSTER J., KATO S., ISHIDA I., SOTO C., ROBL J.M., KUROIWA Y. Production of cattle lacking prion protein. *Nat. Biotechnol.*, 2007, **25**, 132-138.
- ROBL J.M., WANGZ., KASINATHAN P., KUROIWA Y. Transgenic animal production and animal biotechnology. *Theriogenology*, 2007, **67**, 127-133.
- ROTH J.A. Immunosuppression and immunomodulation in bovine respiratory disease. In : Loan R.W. (Ed.), proceedings of bovine respiratory disease, a symposium, Amarillo, Texas on 7th September 1983. A&M University: Texas, 1984, 143-192.
- ROY R. A decade of glycodendrimer chemistry. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 2003, **15**, 291-310.
- SATRAN P., NEDBALCOVA K. Prevalence of serotypes, production of Apx toxins, and antibiotic resistance in strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated in the Czech Republic. *Vet. Med.*, 2002, **47**, 92-98.
- SCHALLER A., DJORDJEVIC S.P., EAMENS G.J., FORBES W.A., KUHN R., KUHNERT P., GOTTSCHALK M., NICOLET J., FREY J. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene apxIVA. *Vet. Microbiol.*, 2001, **79**, 47-62.
- SCHALLER A., KUHN R., KUHNERT P., NICOLET J., ANDERSON T.J., MACINNES J.I., SEGERS R.P., FREY J. Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology*, 1999, **145**, 2105-2116.
- SCHALLER A., KUHNERT P., DE LA PUENTE-REDONDO V.A., NICOLET J., FREY J. Apx toxins in *Pasteurellaceae* species from animals. *Vet. Microbiol.*, 2000, **74**, 365-376.
- SHAMAH S.M., HEALY J.M., CLOAD S.T. Complex target SELEX. *Acc. Chem. Res.*, 2008, **41**, 130-138.
- SHEWEN P.E., WILKIE B.N. Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. *Infect. Immun.*, 1982, **35**, 91-94.
- SHIELS P.G., JARDINE A.G. Dolly, no longer the exception: telomeres and implications for transplantation. *Cloning Stem Cells*, 2003, **5**, 157-160.
- SHIMAOKA M., SPRINGER T.A. Therapeutic antagonists and the conformational regulation of the beta2 integrins. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2004, **4**, 1485-1495.
- SHUSTER D.E., KEHRLI M.E., JR., ACKERMANN M.R., GILBERT R.O. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1992, **89**, 9225-9229.
- SILFLOW R.M., FOREYT W.J. Susceptibility of phagocytes from elk, deer, bighorn sheep, and domestic sheep to *Pasteurella haemolytica* cytotoxins. *J. Wildl. Dis.*, 1994, **30**, 529-535.
- SLOCOMBE R.F., MALARK J., INGERSOLL R., DERKSEN F.J., ROBINSON N.E. Importance of neutrophils in the pathogenesis of acute pneumonic pasteurellosis in calves. *Am. J. Vet. Res.*, 1985, **46**, 2253-2258.
- SMITH G.R. The characteristics of two types of *Pasteurella haemolytica* associated with different pathological conditions of sheep. *J. Pathol. Bacteriol.*, 1961, **81**, 431-440.
- SNEATH P.H., STEVENS M. *Actinobacillus rossii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1990, **40**, 148-153.
- SOLA I., CASTILLA J., PINTADO B., SANCHEZ-MORGADO J.M., WHITELAW C.B., CLARK A.J., ENJUANES L. Transgenic mice secreting coronavirus neutralizing antibodies into the milk. *J. Virol.*, 1998, **72**, 3762-3772.
- SOLER E., THEPOT D., RIVAL-GERVIER S., JOLIVET G., HOUEDBINE L.M. Preparation of recombinant proteins in milk to improve human and animal health. *Reprod. Nutr. Dev.*, 2006, **46**, 579-588.
- SOLOAGA A., VEIGA M.P., GARCIA-SEGURA L.M., OSTOLAZA H., BRASSEUR R., GONI F.M. Insertion of *Escherichia coli* alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol. Microbiol.*, 1999, **31**, 1013-1024.
- SPEER N.C., YOUNG C., ROEBER D. The importance of preventing bovine respiratory disease: a beef industry review. *Bov. Prac.*, 2001, **35**, 189-196.

- STEVENS P.K., CZUPRYNSKI C.J. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces bovine leukocytes to undergo morphologic changes consistent with apoptosis in vitro. *Infect. Immun.*, 1996, **64**, 2687-2694.
- SUN Y., CLINKENBEARD K.D., CLARKE C., CUDD L., HIGHLANDER S.K., DABO S.M. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induced apoptosis of bovine lymphocytes involves DNA fragmentation. *Vet. Microbiol.*, 1999a, **65**, 153-166.
- SUN Y., CLINKENBEARD K.D., CUDD L.A., CLARKE C.R., CLINKENBEARD P.A. Correlation of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin binding with susceptibility to intoxication of lymphoid cells from various species. *Infect. Immun.*, 1999b, **67**, 6264-6269.
- SUN Y., CLINKENBEARD K.D., OWNBY C.L., CUDD L., CLARKE C.R., HIGHLANDER S.K. Ultrastructural characterization of apoptosis in bovine lymphocytes exposed to *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Am. J. Vet. Res.*, 2000, **61**, 51-56.
- TAICHMAN N.S., IWASE M., LALLY E.T., SHATTIL S.J., CUNNINGHAM M.E., KORCHAK H.M. Early changes in cytosolic calcium and membrane potential induced by *Actinobacillus actinomyces* *comitans* leukotoxin in susceptible and resistant target cells. *J. Immunol.*, 1991, **147**, 3587-3594.
- TANAKA K., FUJIMOTO Y., TANAKA S.-I., MORI Y., FUKASE K. Chemistry and chemical biology. Springer: Berlin, 2008, 1240.
- TATUM F.M., BRIGGS R.E., SREEVATSAN S.S., ZEHR E.S., LING HSUAN S., WHITELEY L.O., AMES T.R., MAHESWARAN S.K. Construction of an isogenic leukotoxin deletion mutant of *Pasteurella haemolytica* serotype 1: characterization and virulence. *Microb. Pathog.*, 1998, **24**, 37-46.
- THUMBIKAT P., BRIGGS R.E., KANNAN M.S., MAHESWARAN S.K. Biological effects of two genetically defined leukotoxin mutants of *Mannheimia haemolytica*. *Microb. Pathog.*, 2003, **34**, 217-26.
- THUMBIKAT P., DILEEPAN T., KANNAN M.S., MAHESWARAN S.K. Characterization of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin interaction with bovine alveolar macrophage beta2 integrins. *Vet. Res.*, 2005, **36**, 771-786.
- TIAN L., YOSHIHARA Y., MIZUNO T., MORI K., GAHMBERG C.G. The neuronal glycoprotein telencephalin is a cellular ligand for the CD11a/CD18 leukocyte integrin. *J. Immunol.*, 1997, **158**, 928-36.
- TOUAIBIA M., ROY R. Glycodendrimers as anti-adhesion drugs against type 1 fimbriated *E. coli* uropathogenic infections. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2007, **7**, 1270-83.
- URRUTIA R., HENLEY J.R., COOK T., MCNIVEN M.A. The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, **94**, 377-84.
- VAN DE SANDE-BRUIJNSMA N., GRUNDMANN H., VERLOO D., TIEMERSMA E., MONEN J., GOOSSENS H., FERRECH M. Antimicrobial drug use and resistance in Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 2008, **14**, 1722-30.
- VANDENBERGH P.G., ZECCHINON L., FETT T., DESMECHT D. Lymphocyte function-associated antigen-1 is a receptor for *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIII toxin on porcine (*Sus scrofa*) leukocytes, *sumis*.
- VARKI A., SHARON N. Essentials of glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 2008, 653 p.
- VOGEL J.G., PARROTT C. Mortality survey in feedyards: the incidence of death from digestive, respiratory and other causes in feedyards on the Great plains. *Compend. Contin. Educ. Prac. Vet.*, 1994, **16**, 227-234.
- WALKER R.D., HOPKINS F.M., SCHULTZ T.W., MCCracken M.D., MOORE R.N. Changes in leukocyte populations in pulmonary lavage fluids of calves after inhalation of *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.*, 1985, **46**, 2429-2433.
- WALL R.J., POWELL A.M., PAAPE M.J., KERR D.E., BANNERMAN D.D., PURSEL V.G., WELLS K.D., TALBOT N., HAWK H.W. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat. Biotechnol.*, 2005, **23**, 445-451.
- WANG J.F., KIEBAL R., KOROSTOFF J., GUO T.L., YAMAGUCHI N., ROZMIAREK H., BILLINGS P.C., SHENKER B.J., LALLY E.T. Molecular and biochemical mechanisms of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced cell death. *Microb. Pathog.*, 1998a, **25**, 317-331.
- WANG L.X. Chemoenzymatic synthesis of glycopeptides and glycoproteins through endoglycosidase-catalyzed transglycosylation. *Carbohydr. Res.*, 2008, **343**, 1509-1522.
- WANG Z., CLARKE C., CLINKENBEARD K. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced increase in phospholipase A2 activity in bovine neutrophils. *Infect. Immun.*, 1998b, **66**, 1885-1890.
- WATTS J.L., YANCEY R.J., JR., SALMON S.A., CASE C.A. A 4-year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with bovine respiratory disease in North America. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, **32**, 725-731.
- WEISS D.J., BAUER M.C., WHITELEY L.O., MAHESWARAN S.K., AMES T.R. Changes in blood and bronchoalveolar lavage fluid components in calves with experimentally induced pneumonic pasteurellosis. *Am. J. Vet. Res.*, 1991, **52**, 337-344.
- WELCH R.A., HULL R., FALKOW S. Molecular cloning and physical characterization of a chromosomal hemolysin from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1983, **42**, 178-186.
- WHITELEY L.O., MAHESWARAN S.K., WEISS D.J., AMES T.R., KANNAN M.S. *Pasteurella haemolytica* A1 and bovine respiratory disease: pathogenesis. *J. Vet. Intern. Med.*, 1992, **6**, 11-22.

- YAMAGUCHI N., KIEBA I.R., KOROSTOFF J., HOWARD P.S., SHENKER B.J., LALLY E.T. Maintenance of oxidative phosphorylation protects cells from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin-induced apoptosis. *Cell. Microbiol.*, 2001, **3**, 811-823.
- YATES W.D. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can. J. Comp. Med.*, 1982, **46**, 225-263.
- YOO H.S., RAJAGOPAL B.S., MAHESWARAN S.K., AMES T.R. Purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces expression of inflammatory cytokines from bovine alveolar macrophages. *Microb. Pathog.*, 1995, **18**, 237-252.
- YOUNAN M., FODOR L. Characterization of a new *Pasteurella haemolytica* serotype (A17). *Res. Vet. Sci.*, 1995, **58**, 98.
- ZECCHINON L., FETT T., BAISE E., DESMECHT D. Characterization of the caprine (*Capra hircus*) beta-2 integrin CD18-encoding cDNA and identification of mutations potentially responsible for the ruminant-specific virulence of *Mannheimia haemolytica*. *Mol. Membr. Biol.*, 2004, **21**, 289-295.
- ZECCHINON L., FETT T., DESMECHT D. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Vet. Res.*, 2005, **36**, 133-156.
- ZECCHINON L., FETT T., VANDEN BERGH P., DESMECHT D. Anatomy of the lymphocyte function-associated antigen-1. *Clin. Applied. Immunol. Rev.*, 2006a, **6**, 149-172.
- ZECCHINON L., FETT T., VANDEN BERGH P., DESMECHT D. Bind another day: The LFA-1/ICAM-1 interaction as therapeutic target. *Clin. Applied. Immunol. Rev.*, 2006b, **6**, 173-189.
- ZECCHINON L., FETT T., VANDEN BERGH P., DESMECHT D. LFA-1 and associated diseases: the dark side of a receptor. *Clin. Applied. Immunol. Rev.*, 2006c, **6**, 201-216.
- ZECCHINON L., FETT T., VANDEN BERGH P., DESMECHT D. EGF-3 domain of bovine CD18 is not sufficient to mediate *Mannheimia haemolytica* leukotoxin species-specificity, *submitted*.
- ZHAO Y., SATO Y., ISAJI T., FUKUDA T., MATSUMOTO A., MIYOSHIE, GU J., TANIGUCHI N. Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. *FEBS J.*, 2008, **275**, 1939-1948.
- ZUELKE K.A. Transgenic modification of cows milk for value-added processing. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1998, **10**, 671-676.